

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CLECIANE WALDETÁRIO MARTINS

ANTAGONISTA DO RECEPTOR TIPO AMPA
REVERTE A MODULAÇÃO PRÉ-FRONTAL INDUZIDA PELA
ESTIMULAÇÃO EPIDURAL POR CORRENTE CONTÍNUA
NA MEMÓRIA OPERACIONAL ESPACIAL

VITÓRIA
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

CLECIANE WALDETÁRIO MARTINS

ANTAGONISTA DO RECEPTOR TIPO AMPA
REVERTE A MODULAÇÃO PRÉ-FRONTAL INDUZIDA PELA
ESTIMULAÇÃO EPIDURAL POR CORRENTE CONTÍNUA
NA MEMÓRIA OPERACIONAL ESPACIAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Livia Carla de Melo Rodrigues
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ester Miyuki Nakamura Palacios

VITÓRIA
2016

*Dedico esta dissertação a Cristo
e aos meus tesouros Eunice (mamy), Cleci (papy) e Gleydson (brother).*

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

“Dono de toda ciência, sabedoria e poder, antes que o haja houvesse, Ele já era Deus, Se revelou ao seus, do crente ao ateu, ninguém explica Deus”. Obrigada Pai por ter chegado até aqui, desde o início até o final, tudo foi permissão Sua e para a Sua glória eu concluo o tão sonhado mestrado!

Agradeço ao apoio da minha família que foi primordial, mãe & pai & irmão, gigantes que me fazem enxergar acima das nuvens. Familiares: tios & primos, gigantes que entenderam os dias que eu estive que estar ausente nas festas da família, mas que sempre torceram por mim, amo todos vocês.

Aos meus amigos que não me deixaram só, os *Bests* (Elisa, Igor, Lucas) amizade iniciada no laboratório mas que será para toda vida, me fizeram rir, me deram força, topam tudo por uma boa dose de diversão. *Dangerous* (Jean) valeu por sempre escutar minhas dúvidas dos blots, e sou grata por não deixar o aquário cair e por ter guardado o segredo do Titanic. *Quarteto Fantástico* (Catarina, Chayene e Raphisa) que mesmo distante a nossa amizade e as dúvidas da vida continuam as mesmas. O que começou como, Juliana a mestranda, e eu a iniciação científica, se tornou uma parceria forte de cumplicidade e para a vida toda. Obrigada Ju por sempre ter conselhos de mãe (que foi aperfeiçoado com a chegada do babyHenry) e de amiga. Falando em conselhos, meu muito obrigada a amiga mais hiperativa que já tive, Jaísa, muitos minutos ao telefone, muitas palavras carinhosas. Aos amigos de laboratório, Jozué (o técnico, conselheiro, contator de histórias, amigo), Ingryd, Matheus, vocês são únicos, obrigada por sempre estarem dispostos quando mais precisei. Aos queridos amigos de outros laboratórios que acrescentavam diversão nos momentos de conversas na hora do café, além de conseguirem reagentes e momentos de tirar dúvidas, Marquinhos, Renatinha, Vinícius Mengal, Girlandia, Eduardo, Brunela, Vinícius Zovico, Victor, Gustavo, Randriely, Vanessa, Martiello, Bruna & Bianca.

A minha igreja, Missão, pelo apoio nas orações, nas conversas, por realizarem o verdadeiro cristianismo e por me acolherem como família.

As alunas de iniciação científica, Fernanda e Luana, que trabalharam com tanta garra e disciplina durante todo o decorrer dessa pesquisa. Obrigada meninas pelo desempenho e a alegria de vocês.

As professoras Suely e Cristina, por participarem da minha banca de qualificação e por fazerem comentários edificantes para essa pesquisa. Ao professor Thiago de Melo por sempre me acalmar nos momentos de desespero com os experimentos bioquímicos e por ceder a bancada do seu laboratório lá no início de tudo.

Ao professor Valério, por aceitar participar da banca de conclusão do mestrado. Obrigada, também, por me ajudar no passo a passo da técnica de Western Blot (resultados que, infelizmente, ficarão para um segundo momento).

A professora Angela, por ter me acolhido na FMUSP e ter me ensinado a crescer tanto na vida pessoal quanto na profissional. Uma honra tê-la na banca de conclusão do mestrado.

E as minhas mentoras na vida científica e acadêmica: professoras Lívia e Ester.

A Ester por ter abrido as portas do LCCNPF para mim, começando a minha vida como iniciação científica. Foi um tempo de crescimento em todos os sentidos e graças a você sou uma amante e aspirante a neurocientista. Obrigada por tudo!

A Lívia pela oportunidade do mestrado, pelas conversas, pela disposição, por ter me apresentado o blot.. ai que maravilha! Meu muito obrigada por todo esse tempo de convivência e aprendizado!

Agradeço ao CNPq por proporcionar suporte financeiro para a realização deste trabalho.

E a todos que participaram de forma direta ou indiretamente.

Todos esses são os gigantes da minha vida!

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	V
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES.....	VI
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Estimulação cerebral por corrente contínua.....	2
1.1.1. Histórico.....	2
1.1.2. A estimulação transcraniana por corrente contínua.....	4
1.1.3. Aspectos técnicos e segurança na utilização da estimulação transcraniana por corrente contínua.....	6
1.1.4. Possíveis mecanismos de ação.....	9
1.1.5. Estimulação epidural por corrente contínua.....	11
1.2. Córtex pré-frontal.....	12
1.2.1. Divisão anátomo-funcional do córtex pré-frontal.....	12
1.2.2. Funções do córtex pré-frontal.....	15
1.2.3. O córtex pré-frontal e a memória operacional.....	16
1.3. Sistema Glutamatérgico.....	19
1.3.1. Neuroquímica.....	19
1.3.2. Receptores glutamatérgicos.....	21
1.3.3. Um novo antagonista AMPAérgico: Perampanel.....	25
2. OBJETIVOS	
2.1. Geral.....	28
2.2. Específicos.....	28

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais.....	29
3.2. Delineamento experimental.....	29
3.3. Avaliação comportamental.....	31
3.3.1. Labirinto radial de 8 braços.....	31
3.3.1.1. Aquisição da tarefa.....	33
3.4. Cirurgia estereotáxica.....	36
3.5. Droga: Preparo e administração do Perampanel.....	38
3.6. Estimulação epidural por corrente contínua.....	39
3.7. Análises Estatísticas.....	41

4. RESULTADOS

4.1. Pesos corporais durante as fases de treinamento.....	43
4.2. Aquisição da tarefa.....	44
4.2.1. Fase IV: sem a tarefa de retardo.....	44
4.2.2. Fase V: com a tarefa de retardo de 5 segundos.....	45
4.3. Experimentos.....	47
4.3.1. Experimento I – Receptores AMPA e memória operacional.....	47
4.3.2. Experimento II – Receptores AMPA, EECC e memória operacional.....	49

5. DISCUSSÃO..... 52

6. CONCLUSÕES..... 60

7. REFERÊNCIAS..... 61

RESUMO

A modulação da excitabilidade no córtex pré-frontal (CPF) pela estimulação elétrica por corrente contínua melhora as funções cognitivas. No entanto, a compreensão dos seus mecanismos subjacentes permanece desconhecida. *Objetivo:* Investigar o envolvimento de receptores glutamatérgicos do tipo ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) nos efeitos da estimulação epidural por corrente contínua (EECC) na memória operacional espacial de longo prazo. *Métodos:* Ratos treinados previamente no labirinto radial de 8 braços (LR-8) receberam a administração aguda intraperitoneal (IP) do antagonista AMPAR, perampanel (PRP, 1 mg / kg) ou seu veículo (VEH) antes de executar tarefas com retardo de 4 horas. Esses testes com PRP ou VEH foram realizados antes e depois de sessões repetitivas de EECC anódica (400 mA, 13 minutos) uma vez por dia ao longo de cinco dias consecutivos ou por estimulação simulada (sham), sobre o CPF medial esquerdo, local de implante dos eletrodos. *Resultados:* Os animais tratados com PRP (n = 27) apresentaram maior número de erros ($p < 0,01$) no teste pós-retardo de 4 horas comparados ao grupo VEH (n = 26). Após as sessões de EECC, os animais tratados com VEH (n = 13) apresentaram menor número de erros no desempenho do pós-retardo de 4 horas no LR-8 comparados ao grupo VEH/sham ($p = 0,05$, n = 12) e PRP/EECC ($p = 0,001$, n = 13). Os animais que receberam PRP/EECC tiveram maior número de erros ($p = 0,025$) comparados ao grupo PRP/sham (n = 12). *Conclusões:* O antagonismo dos AMPARs prejudicou a memória operacional espacial e bloqueou os efeitos facilitatórios da estimulação elétrica contínua anódica aplicada sobre o CPF medial esquerdo. Portanto, a modulação cognitiva pré-frontal pela estimulação por corrente direta parece ser altamente dependente da atividade de receptores do tipo AMPA.

Palavras-chave: EECC; Memória operacional; Córtex Pré-frontal; Sistema glutamatérgico; Perampanel.

ABSTRACT

The modulation of the prefrontal cortex (PFC) excitability by direct current stimulation improves cognitive function. However, the underlying mechanisms remains unknown. Here we investigated the involvement of glutamate α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors (AMPA) on the effects of repetitive epidural direct current stimulation (eDCS) on long-termed spatial working memory. *Methods:* Well-trained rats in 8-arm radial maze (8-RM) procedures received acute intraperitoneal (IP) administration of the AMPAR antagonist, perampanel (PRP, 1 mg/kg) or its vehicle (VEH) before performing 4-h delayed tasks in 8-RM. This drug intervention was performed before or after repetitive (once daily, five consecutive days) anodal eDCS (400 μ A, 13 minutes) over the left medial PFC or sham procedure. *Results:* Animals treated with PRP ($n = 27$) showed larger number of errors ($p < 0.01$) in the 4-h post-delayed performance compared to those treated with VEH ($n = 26$). After the repetitive eDCS, animals treated with VEH ($n = 13$) presented smaller number of errors in the 4-h post-delay performance compared to animals receiving VEH after sham ($p = 0.05$, $n = 12$) and those receiving PRP after eDCS ($p = 0.001$, $n = 13$). These animals receiving PRP after eDCS showed larger ($p = 0.025$) number of errors when compared to those treated with PRP after sham ($n = 12$). *Conclusions:* AMPARs antagonism disrupted the spatial working memory and reversed the facilitating effects of the eDCS applied over the medial PFC. Thus, the spatial working memory and the prefrontal cognitive modulation by the direct current stimulation are highly dependent on AMPARs activity.

Keywords: eDCS; Working memory; Prefrontal cortex; Glutamatergic system; Perampanel.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Histórico da estimulação cerebral.....	3
FIGURA 2. Alteração no disparo neuronal espontâneo após aplicação de corrente catódica ou anódica.....	5
FIGURA 3. Ilustração do instrumento utilizado para gerar a corrente contínua.....	6
FIGURA 4. Diagrama de dispersão da corrente aplicada sobre o couro cabeludo até chegar à área cerebral alvo a ser estimulada.....	8
FIGURA 5. Divisões do CPF do homem em perspectivas lateral (A), medial (B) e orbital (C); numeradas segundo o mapa arquitetônico de Brodmann (1909).....	13
FIGURA 6. Sub-regiões do CPF de roedores.....	14
FIGURA 7. Ilustração dos sinais de entrada e saída das sub-regiões do CPF e suas respostas aos estímulos.....	16
FIGURA 8. Ilustração do Labirinto Radial de 8 braços.....	17
FIGURA 9. Estrutura química do Glutamato.....	19
FIGURA 10. Neurotransmissão glutamatérgica.....	20
FIGURA 11. Famílias dos receptores do sistema glutamatérgico com suas respectivas subunidades	21
FIGURA 12. Ilustração da estrutura do receptor metabotrópico glutamatérgico.....	22
FIGURA 13. Os receptores do tipo NMDA possuem uma estrutura complexa com diferentes sítos de ligação para glutamato, glicina, Mg^{2+} , Zn^{2+} , poliaminas e a fenciclidina (PCP).....	23
FIGURA 14. Ilustração do receptor tipo AMPA.....	24
FIGURA 15. Ilustração do receptor do tipo Cainato.....	25
FIGURA 16. Estrutura química do fármaco Perampanel.....	26
FIGURA 17. O Perampanel inibe as correntes evocadas do AMPAR em neurônios do hipocampo..	27
FIGURA 18. Diagrama do protocolo experimental.....	31

FIGURA 19. Sala de experimentação: Labirinto Radial de 8 braços.....	33
FIGURA 20. Animal executando a fase IV no LR-8.....	35
FIGURA 21. Diagrama experimental da fase de teste com retardo.....	35
FIGURA 22. Cirurgia estereotáxica para implante de eletrodo.....	37
FIGURA 23. Posicionamento dos eletrodos durante a estimulação.....	39
FIGURA 24. Materiais utilizados no protocolo para EECC ou sham.....	40
FIGURA 25. Média dos pesos corporais (g) \pm e.p.m.....	43
FIGURA 26. Média de erros \pm e.p.m. nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV no LR-8.....	44
FIGURA 27. Média de erros \pm e.p.m do desempenho dos animais durante o pré- (à esquerda) e pós-retardo (à direita), ao longo das últimas 5 sessões.....	46
FIGURA 28. Efeitos da administração aguda de perampanel (n=27) na dose de 1 mg/kg ou do veículo (n=26) sobre o desempenho (média de erros \pm e.p.m.) de animais no pré- (à esquerda) e pós-retardo (à direita) de 4h no LR-8.....	48
FIGURA 29. Efeitos dos tratamentos VEH/sham (n = 12), PRP/sham (n = 14), VEH/EECC (n = 13) e PRP/EECC (n = 14) sobre o desempenho (média de erros \pm e.p.m.) no pré- (à esquerda) e pós-retardo (à direita) de 4h no LR-8.....	50
FIGURA 30. Representação esquemática da circuitaria glutamatérgica do CPF, conexões com o ambiente externo, através das vias aferentes e eferentes, assim como com áreas corticais e subcorticais.....	54

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. pelos animais (n = 53) em cada braço visitado durante as fases de treinamento no decorrer das últimas 10 sessões..... 45

TABELA 2. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. pelos animais (n = 53) em cada braço visitado no pré- e pós-retardo de 5 segundos no decorrer das últimas 5 sessões de treinamento na fase V.. 47

TABELA 3. Efeitos da administração aguda de Perampanel na dose de 1 mg/kg (n=27) ou do veículo (n=26) sobre o tempo gasto (em segundos) em cada braço visitado no pré- e pós-retardo de 4h de testes realizados no LR-8..... 48

TABELA 4. Efeitos dos diferentes tratamentos (VEH/SHAM, PRP/SHAM, VEH/EECC e PRP/EECC) sobre o tempo gasto (em segundos) em cada braço visitado no pré- e pós-retardo de 4 h de testes realizados no LR-8..... 51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPAR	Receptor α -amino-3-hidroxi-metil-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise de variância
AVC	Acidente vascular cerebral
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAR	Receptor cainato
CCA	Córtex cingulado anterior
Cg1	Área 1 do cingulado anterior
COF	Córtex orbitofrontal
CPF	Córtex pré-frontal
CPFDL	Córtex pré-frontal dorsolateral
CPFm	Córtex pré-frontal medial
DP	Desvio padrão
e.p.m.	Erro padrão da média
EAAT	Transportadores de aminoácidos excitatórios
EECC	Estimulação Epidural por Corrente Contínua
EEG	Eletroencefalograma
ETCC	Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua
fMRI	Ressonância magnética funcional
GABA	Ácido gama aminobutírico
GLU	Glutamato
IP	Injeção Intraperitoneal
LR-8	Labirinto radial de oito braços
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
Mg ²⁺	Íon magnésio
mGluR	Receptor glutamatérgico metabotrópico
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
MK-801	Maleato de (+)5-metil-10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,b]-ciclohepteno-5,10-imina ou dizocilpina

Na ⁺	Íon sódio
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil-benzo[f]quinoxalina-2,3-diona
NMDAR	Receptor N-metil-D-aspartato
PCP	Fenciclidina
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
PRP	Perampanel
Sham	Estimulação simulada
VEH	Solução veículo

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estimulação cerebral por corrente contínua

1.1.1. Histórico

A história da Ciência é marcada por constantes redescobertas e renovações de conceitos. O uso da eletricidade como forma de intervenção antecede os estudos de Luigi Galvani e a criação da pilha voltaica. Scribonius Largus, médico da Roma antiga, já descrevia a aplicação de descarga elétrica provenientes de peixes elétricos para o tratamento de dores de cabeça (Boggio, 2006).

O desenvolvimento da pilha voltaica ocorreu no século XVIII, o que possibilitou a geração de eletricidade e seu uso de forma mais sistemática. Foi preciso esperar até o século XIX para que fossem dados novos e importantes passos no campo da estimulação cerebral (Nitsche et al., 2003). Em 1804, Giovanni Aldini, professor de física na Universidade de Bolonha e sobrinho de Galvani, realizou estimulações elétricas no córtex cerebral exposto de prisioneiros recém-decapitados, e relatou que a estimulação cortical evocava terríveis caretas. Mais tarde, Aldini também relatou que a aplicação de correntes galvânicas sobre a cabeça em pacientes que sofriam de melancolia levou a uma resposta clínica eficaz. Esses e outros achados levaram-no a concluir que a superfície cortical era passível de ser estimulada eletricamente, e que isso poderia ser útil no tratamento de vários distúrbios neuropsiquiátricos (Sironi, 2011). Os estudos de Aldini culminaram no surgimento de dois grandes ramos de investigação da estimulação cerebral: (1) Investigação neurofisiológica e (2) Investigação terapêutica. A partir daí muitos outros pesquisadores fizeram uso extensivo das correntes galvânicas para o tratamento de desordens mentais (Priori, 2003) e essas evidências do uso potencial da corrente elétrica como intervenção terapêutica exigem uma compreensão mais detalhada de seus efeitos e isso pode ser melhor evidenciado através de estudos experimentais (Figura 1).

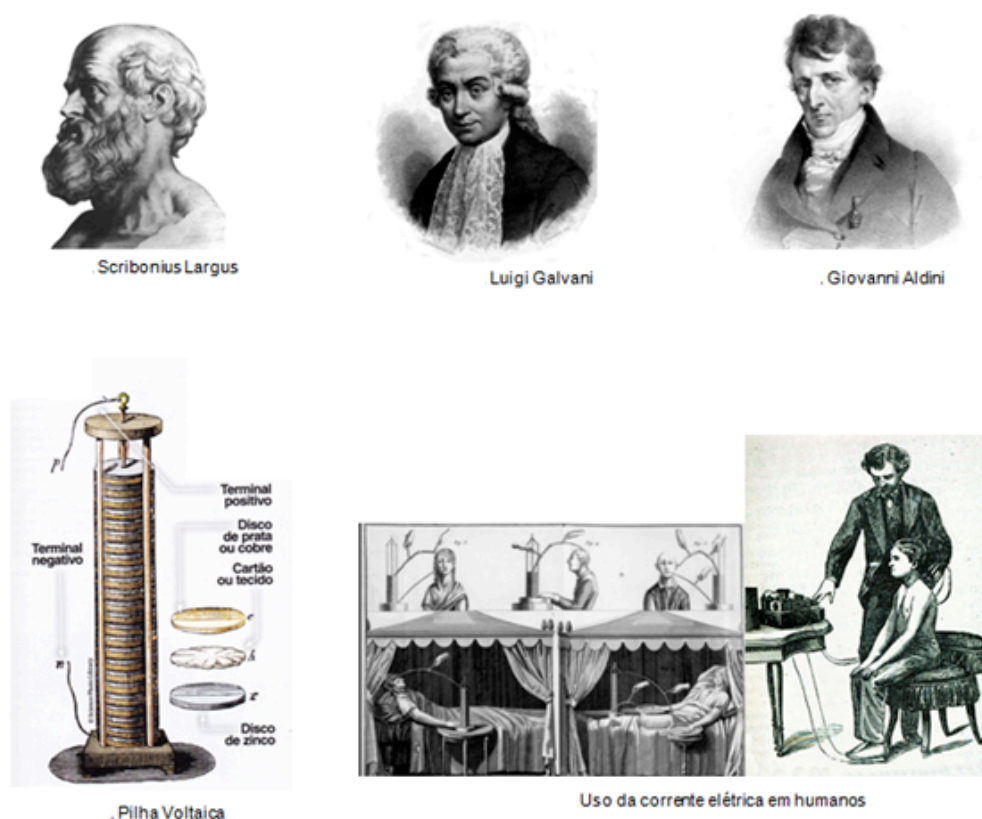


FIGURA 1. Histórico da estimulação cerebral.

Já na era moderna um dos exemplos de estimulação cerebral para fins terapêuticos foi no tratamento da psicose severa, realizado por Ugo Cerletti em 1938, através do eletrochoque (Boggio, 2006). Esta técnica evocava uma convulsão epilética que, de um modo grosseiro, remodelaria as conexões neuronais, fornecendo melhoria clínica aos pacientes (Andrade et al., 2010). E em paralelo à evolução da estimulação elétrica craniana, foi-se desenvolvendo a estereotaxia (Levy, 2011), um método de localização precisa de áreas no cérebro, através de coordenadas. Entre 1946 e 1947 o neurologista Spiegel e o neurocirurgião Wycis desenvolveram o primeiro aparelho estereotático para o homem (Levy, 2011), o que favoreceu a focalização da estimulação de áreas cerebrais. No entanto, o neurofisiologista José M. Delgado, no ano de 1952, baseado em sua experiência com estimulação neurofisiológica profunda em animais de laboratório, propôs uma técnica de implantação de eletrodos para estimulação crônica com o propósito de diagnóstico e possível efeito terapêutico em pacientes psicóticos (Levy, 2011).

Com o avanço da ciência e de questões ainda não esclarecidas, a estimulação cerebral tem se consolidado e ganhado destaque na sociedade científica como um tratamento em potencial para doenças neurológicas. De modo geral, a estimulação cerebral pode abranger técnicas invasivas (como a estimulação cerebral profunda), semi-invasivas (como as epidurais) e não-invasivas (como as transcranianas), com o intuito de reativar estruturas hipoativas, inibir estruturas hiperativas, aprimorar o processo natural de reorganização cortical e modular atividades em circuitos corticais e subcorticais (Stagg & Nitsche, 2011).

1.1.2. A estimulação transcraniana por corrente contínua.

Por volta dos anos 1960 a Estimulação Transcraniana por Corrente Contínua (ETCC), do inglês, *Transcranial Direct Current Stimulation* (tDCS) ganhou destaque como uma ferramenta de modulação cortical não-invasiva, indolor e de fácil aplicação. (Nitsche et al., 2003). Este tipo de estimulação produz uma variação no potencial de repouso da membrana, facilitando (corrente anódica) ou dificultando (corrente catódica) o disparo neuronal dependendo da polaridade aplicada (Brunoni & Ferrucci, 2012). As evidências do uso potencial da corrente elétrica como uma possível intervenção terapêutica exigem uma compreensão mais detalhada dos efeitos da corrente elétrica e de sua aplicação que podem ser evidenciados em estudos experimentais em animais.

Em 1964, Purpura & McMurtry (*apud* Rahman et al., 2013) apresentaram um estudo em células do trato piramidal de gatos onde foram observados os efeitos pós estimulação por corrente contínua anódica ou catódica. A densidade de corrente aplicada variou entre 30 a 400 $\mu\text{A}/\text{mm}^2$ e não foi observada atividade convulsiva. Os autores verificaram um aumento da atividade neuronal espontânea após passagem de corrente anódica e redução após a catódica (Figura 2).

Na ausência de atividade espontânea, foi verificado que a estimulação anódica iniciou descargas fixas de frequência entre 10 e 30Hz, e essas atividades cessavam quando a estimulação era interrompida. Além disso, os autores observaram que na estimulação anódica a despolarização das membranas ocorria em alta frequência e baixa amplitude. Em períodos de atividade espontânea de baixa frequência, a

estimulação catódica silenciou imediatamente a atividade, o que pode ser observado na Figura 2. Essa atividade reapareceu, aproximadamente, com a mesma frequência após a interrupção da estimulação catódica.

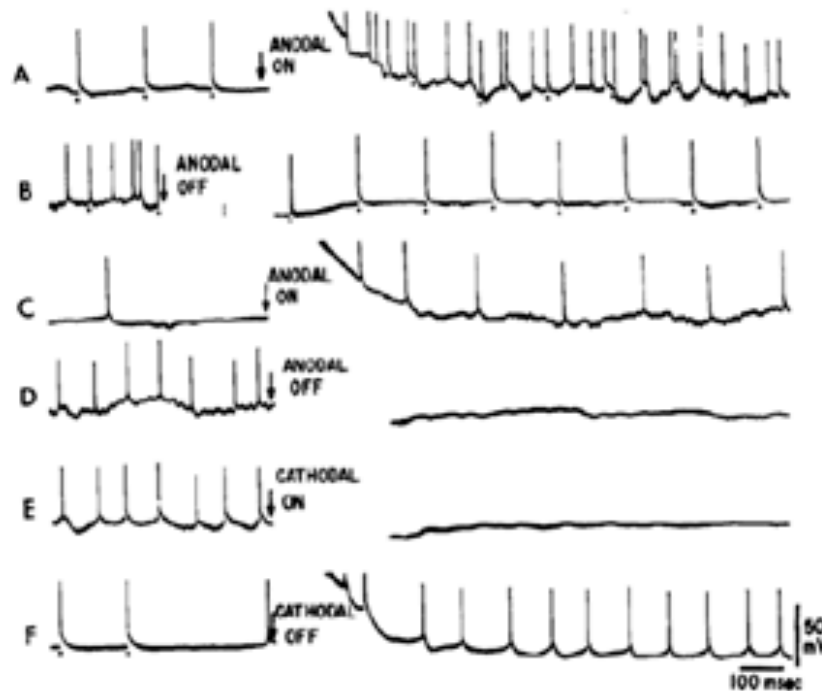


FIGURA 2. Alteração no disparo neuronal espontâneo após aplicação de corrente catódica ou anódica (Extraído de Purpura & McMurtry, 1964).

No ano de 1966, em dois artigos publicados na quarta edição da “Neuropsychologia”, D.J. Albert mostrou que a estimulação elétrica catódica do córtex medial prejudicou a memória de ratos enquanto a estimulação anódica estimulou a consolidação da memória. Outros estudos em animais também mostraram que a estimulação cerebral alterava a atividade e a excitabilidade cerebral (Fregni et al., 2005).

A ETCC é uma técnica simples, segura e poderosa de modulação cerebral que ocorre através da aplicação de uma corrente elétrica de baixa intensidade na superfície do crânio provocando mudanças reversíveis na excitabilidade cortical (Hummel et al., 2005), e que tem demonstrado efeitos potencialmente benéficos em

diversas doenças neurológicas e psiquiátricas, como no Acidente Vascular Encefálico (Fregni et al., 2005), depressão (Fregni et al., 2006), epilepsia (Fregni et al., 2006) doença de Parkinson (Fregni et al., 2006), e na redução da compulsão em usuários de drogas e alcoolistas (Boggio et al., 2010; Nakamura-Palacios et al., 2011).

1.1.3. Aspectos técnicos e segurança na utilização da ETCC

O instrumento utilizado para gerar a corrente contínua é constituído basicamente por eletrodos (ânodo e cátodo), amperímetro (medidor da intensidade da corrente elétrica), potenciômetro (resistor que controla a tensão) e um jogo de baterias (Figura 3). Em geral, são utilizados dois procedimentos: (1) estimulação ativa (por corrente anódica ou catódica) e (2) estimulação sham (os eletrodos são posicionados, porém não há corrente sendo gerada no estimulador) como condição controle.

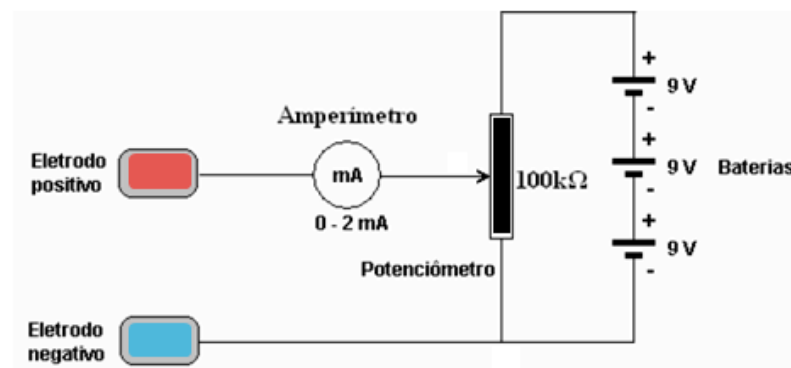


FIGURA 3. Ilustração do instrumento utilizado para gerar a corrente contínua (Extraído e Modificado de Boggio, 2006).

Os eletrodos (sufixo derivado do grego *hodós*, que significa *via*) são os dispositivos que fazem com que a corrente elétrica se transmita do fio metálico para o sujeito do estudo. Os eletrodos podem transmitir uma corrente anódica (pólo positivo), que tem como característica facilitar os disparos neuronais, ou uma corrente catódica (pólo negativo), que dificultaria esses disparos neuronais (Nitsche et al., 2003). Alguns estudos mais recentes apresentaram dados demonstrando que dependendo da intensidade, local de aplicação e número de repetições das sessões essas

características dos eletrodos podem se inverter, ou seja, a corrente anódica dificultar e a catódica facilitar os disparos neuronais (Shin et al., 2015; Nitsche et al., 2015; Summers et al., 2016).

A fonte de energia elétrica é obtida através da associação em série de 3 baterias de 9 volts, o que resulta em uma tensão total de 27 volts. Esta tensão é aplicada nos extremos de um potenciômetro (reostato) com resistência igual a 100 kOhms. A função do potenciômetro é a de possibilitar uma tensão ajustável que varia de 0 a 27 volts.

Esta fraca corrente pode induzir mudanças focais da excitabilidade cortical, aumentando ou diminuindo dependendo da polaridade do eletrodo, que persistem após o período de estimulação. A direção e duração das alterações na excitabilidade dependem da polaridade dos eletrodos, intensidade e duração da estimulação aplicada (Nitsche & Paulus, 2001).

Por se tratar de uma estimulação transcraniana, ou seja, aplicada sobre o couro cabeludo, parte da corrente sofre dispersão durante a passagem pela superfície da pele, osso e meninges. Estima-se que pelo menos 50% da corrente seja perdida antes de alcançar o córtex cerebral (George & Aston Jones, 2010; Rush & Driscoll 1968 *apud* Nitsche et al., 2003) (Figura 4). Também por esta razão essa técnica apresenta baixa focalidade, ou seja, a porção da corrente que atravessa as barreiras naturais abrange uma área cortical mais dispersa em torno da estrutura que seria o objeto de estimulação.

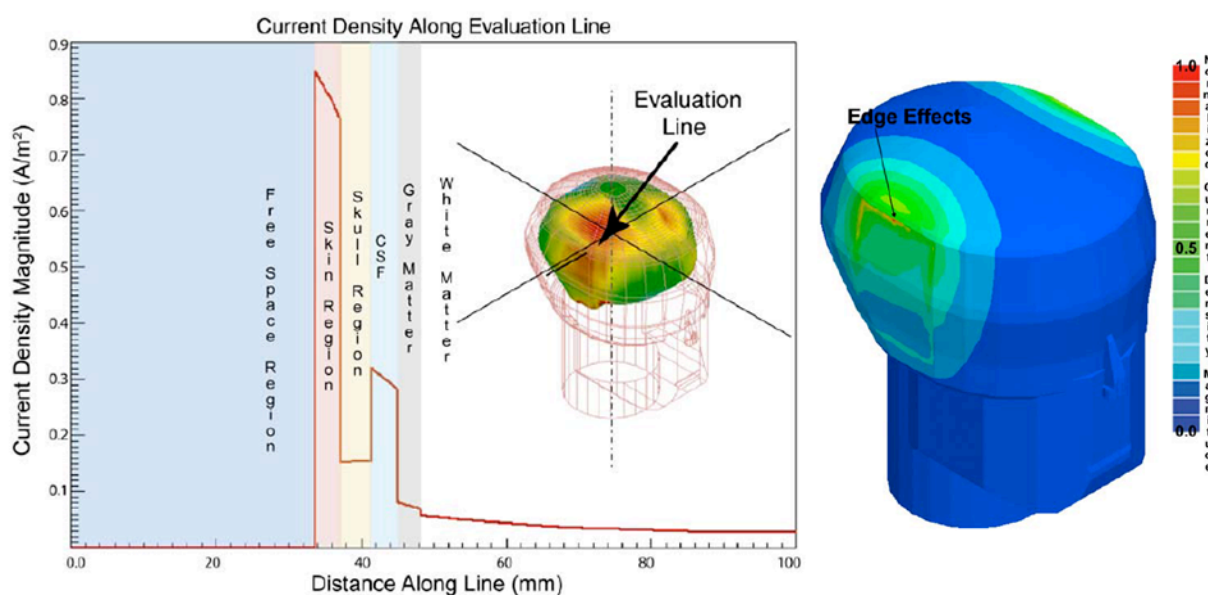


Figura 4. Diagrama de dispersão da corrente aplicada sobre o couro cabeludo até chegar à área cerebral alvo a ser estimulada (Extraído de Nitsche et al., 2003).

Essa técnica é considerada bastante segura, já que raros são os estudos em que há algum relato de efeito colateral importante durante ou após a ETCC. Os mais comumente mencionados são: prurido ou formigamento, leve queimação ou desconforto sob o local do posicionamento dos eletrodos e cefaléia (Brunoni et al., 2011). A observação de alguns parâmetros como intensidade de corrente, tamanho de eletrodo utilizado, tempo de aplicação, cálculos de densidade de corrente e carga total sinalizam que a técnica é realmente segura para ser aplicada no homem e em animais de laboratório (Boggio, 2006).

Nitsche et al (2004) realizaram estudos de imagem por ressonância magnética antes e após 30 e 60 minutos da estimulação cerebral aplicada no córtex motor ou pré-frontal. Os pesquisadores não observaram nenhuma alteração patológica pelas imagens, concluindo que a ETCC não induziu edema cerebral, alterações da barreira hematoencefálica ou do tecido cerebral.

Em um estudo anterior os autores não observaram variação na concentração de enolase, uma proteína que pode ser considerada um marcador biológico de morte

neuronal, e a não alteração deste indicador forneceu mais elementos sobre a segurança da técnica (Nitsche et al., 2003).

Outro estudo ainda demonstrou que a aplicação de ETCC, seja anódica ou catódica, aplicada na região occipital ao longo de 20 minutos, não alterou índices de batimento cardíaco, pressão arterial ou temperatura durante ou após a estimulação, sinalizando que a ETCC não induziu qualquer efeito relacionado à ativação do tronco cerebral (Accornero et al., 2007).

1.1.4. Possíveis mecanismos de ação

Estudos que associam a ETCC com outras técnicas de imagem e mapeamento cerebral, como a ressonância magnética funcional (fMRI), a tomografia por emissão de pósitrons (PET) e a eletroencefalografia (EEG) têm revelado dados muito promissores e demonstram que a ETCC parece modular a função cortical do cérebro humano induzindo mudanças focais, prolongadas, porém reversíveis, da excitabilidade cortical (Nitsche et al., 2008).

Os efeitos imediatos da ETCC são gerados pela mudança do potencial de repouso da membrana, enquanto os efeitos em longo prazo dependem de mecanismos de plasticidade cortical, possivelmente, mediados por neurotransmissores no SNC (Nitsche et al., 2003); entretanto, pouco se sabe sobre a relação das sinapses com canais iônicos e receptores durante a ETCC.

Bindman et al (1962) realizaram estudos eletrofisiológicos em animais, que forneceram evidências dos efeitos na excitabilidade cortical em longo prazo provocados pela aplicação de corrente contínua no córtex cerebral. Estudo conduzido por Gartside et al (1968) utilizando bloqueadores de síntese protéica como a actinomicina D e puromicina de 7-12h antes da estimulação, demonstrou que o aumento da taxa de disparo após período de estimulação cortical superior a 10 minutos não ocorreria por meio de circuitos reverberantes, mas por mudanças na condução sináptica (Gartside et al., 1968 *apud* Rahman et al., 2013).

Estudos que envolvem os sistemas de neurotransmissores têm ampliado o conhecimento acerca da estimulação elétrica cerebral, e todos os dados provenientes dessas pesquisas consolidam o pensamento de que a estimulação elétrica, em suas diferentes polaridades, também possui um papel promissor nos mecanismos de plasticidade sináptica, tais como na LTP (*do inglês, Long-term potentiation*) e LTD (*do inglês, Long-term depression*), como demonstrado recentemente em que sessões sucessivas de ETCC dentro de uma janela temporal específica foi capaz de induzir plasticidade similar à LTP com duração maior do que 1 hora no córtex motor de humanos (Monte-Silva et al., 2013). Esses estudos farmacológicos têm elucidado em parte os efeitos da ETCC anódica através da participação de canais de sódio e cálcio (Liebetanz et al., 2002; Nitsche et al., 2003), bem como os efeitos da ETCC catódica que estão intimamente relacionados à atividade do receptor glutamatérgico do tipo NMDA (Liebetanz et al., 2002; Nitsche et al., 2004).

Nessa perspectiva acredita-se que a estimulação elétrica cerebral por corrente contínua esteja intimamente relacionada à neuromodulação cerebral, que é a capacidade que esse tipo de estimulação tem de inibir, estimular ou modificar a regulação da atividade elétrica e química do sistema nervoso central e periférico, ou seja, constitui-se em um processo reversível e ajustável (Nitsche et al., 2015; Fregni et al., 2015).

Tais mecanismos de neuroplasticidade são centrais no processo de aprendizagem e memória e a ETCC é uma ferramenta que tem contribuído para pesquisas nas áreas de neurociências e de reabilitação neuropsicológica. Entretanto, suas implicações técnicas resultam em questionamentos parcialmente respondidos até os dias atuais.

1.1.5. Estimulação epidural por corrente contínua.

Uma importante limitação da técnica de ETCC é sua baixa focalidade espacial. A baixa focalidade da estimulação restringe a utilização da ETCC em protocolos por duas razões principais: (1) o tamanho relativamente largo do eletrodo normalmente utilizado atinge em muitos casos não apenas a área de interesse, mas também áreas corticais adjacentes, o que limita a interpretação dos resultados experimentais e pode ser disfuncional em estudos básicos e clínicos; (2) Outro fator importante, já descrito anteriormente, é a grande perda de corrente que ocorre na sua passagem pela superfície da pele, osso e meninges (Nitsche et al. 2003).

Considerando essas limitações na utilização da ETCC e o grande número de possibilidades terapêuticas que se apresentam com as técnicas de neuromodulação, seria de grande relevância o desenvolvimento de uma alternativa que apresente uma maior focalidade aliada a uma menor perda da corrente elétrica. Assim, haveria um avanço no desenvolvimento de novas técnicas, seja para a aplicação de forma terapêutica e/ou para melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à estimulação elétrica.

A Estimulação Epidural por Corrente Contínua (EECC) é um modelo desenvolvido pioneiramente por um grupo de pesquisa de nosso laboratório e que utiliza eletrodos posicionados diretamente acima da dura-máter, o que diminui a perda da corrente aplicada e aumenta a focalidade da estimulação, possibilitando uma aplicação mais precisa da técnica. Os resultados já publicados que utilizaram a EECC relatam que a EECC anódica na intensidade de 400 μ A melhorou no desempenho dos animais no LR-8 (de Souza Custódio et al., 2013) o que corrobora com os estudos de Fregni et al (2005) onde a estimulação anódica (ETCC) facilitou a memória operacional de indivíduos saudáveis.

Em 2014, Alves investigou o possível envolvimento do sistema glutamatérgico na memória operacional de animais após administração da Memantina, um antagonista não-competitivo do NMDAR e da EECC anódica. Os dados sugerem que a ação da EECC envolve a participação de receptores do tipo NMDA, assim como na ETCC (Nitsche et al., 2003), pois a EECC anódica atenuou o prejuízo da memória operacional produzido pela Memantina; entretanto, não parece ser um mecanismo

único e é sugerido um sinergismo entre a EECC e a Memantina (*dados não publicados*).

Esses dados corroboram com os demais achados clínicos, onde autores evidenciaram a melhora do desempenho de tarefas cognitivas, através de estimulação anódica no córtex pré-frontal, e do envolvimento do sistema glutamatérgico nos mecanismos da estimulação elétrica (Nitsche et al., 2003; Nitsche et al., 2004).

1.2. Córtex pré-frontal

1.2.1. Divisão anátomo-funcional do córtex pré-frontal

Os lobos frontais são as porções mais anteriores do cérebro, correspondendo a toda a área anterior ao sulco central e superior à fissura de Sylvius (Adams et al., 1997). Ontogeneticamente foram as últimas estruturas do hemisfério cerebral a se formarem, sendo pouco desenvolvida em animais inferiores e consideravelmente grande em primatas (Kolb, 1984).

Os lobos frontais são divididos em uma região mais posterior, que corresponde ao giro pré-central ou área motora primária em humanos, que quando eletricamente estimulada produz movimentos; e uma região mais rostral, anterior ao sulco pré-central, cuja estimulação elétrica não produz ativação motora ou sensorial: essa região foi denominada córtex pré-frontal (CPF) ou córtex granular frontal (Kolb, 1984; Adams et al., 1997 *apud* Leonard, 2016).

Delimitar a região do CPF entre as espécies ainda é difícil devido à grande variação anatômica, arquitetônica e conectiva (Dalley et al., 2004). Mas no cérebro de mamíferos (Figura 5), esta região é usualmente definida pelos critérios de citoarquitetura e conectividade. Esses critérios são utilizados para delimitar um território cortical, que é caracterizado por uma proeminente camada celular IV, ou camada granular, e maciças projeções provindas do núcleo médio-dorsal do tálamo (Fuster, 2002). Em primatas humanos e não-humanos, o CPF está localizado rostralmente às áreas motoras do córtex cerebral, sendo dividido em quatro regiões

anatomicamente definidas (lateral, medial, ventral e orbital), as quais foram subdivididas por Brodmann em áreas que variam de acordo com sua citoarquitetura (Fuster, 2002). Sendo assim no homem o CPF pode ser dividido em quatro áreas de acordo com sua citoarquitetura: área oculomotora (área 8 de Brodmann); dorsolateral (áreas 9 e 10 de Brodmann); orbitofrontal lateral (área 10 de Brodmann) e área do cíngulo anterior ou córtex pré-frontal medial (CPFm) (área 24 de Brodman) (Figura 5) (Fuster, 2002).

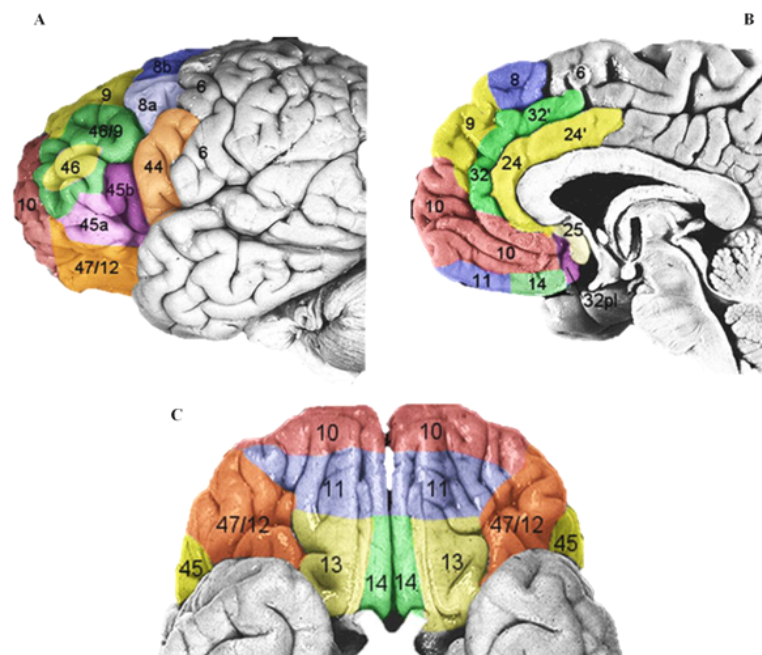


FIGURA 5. Divisões do CPF do homem em perspectivas lateral (A), medial (B) e orbital (C); numeradas segundo o mapa arquitetônico de Brodmann (1909) (Extraído e Modificado de Ridderinkhof et al., 2004).

Já em roedores, o CPF não pode ser definido por suas características citomorfológicas devido à ausência do córtex granular (Uylings, Groenewegen e Kolb 2003). Desse modo Rose e Woolsey (1948) propuseram que o CPF em roedores corresponderia à área que recebe maciça projeção do núcleo médio-dorsal do tálamo, e este campo de projeção seria equivalente em diversas espécies de mamíferos (Rose e Woolsey, 1948 *apud* Uylings et al., 2003). Com o advento de refinadas técnicas de tracejamento anterógrado e retrógrado, foi possível caracterizar o CPF em roedores subdividindo em áreas infralímbica (IL), pré-límbica (PrL), cíngulo anterior, ventral e dorsal (ACg ou Cg1, ACd e Cg2); área pré-central (Fr2 ou PrC), área orbital (medial- MO, ventral- VO, ventro-lateral- VLO e lateral-

LO); e em área agranular insular ventral e dorsal (AIV e AID) que compõem o córtex gustatório (Figura 6) (Dalley, 2004; Uylings et al., 2003; Vertes 2002).

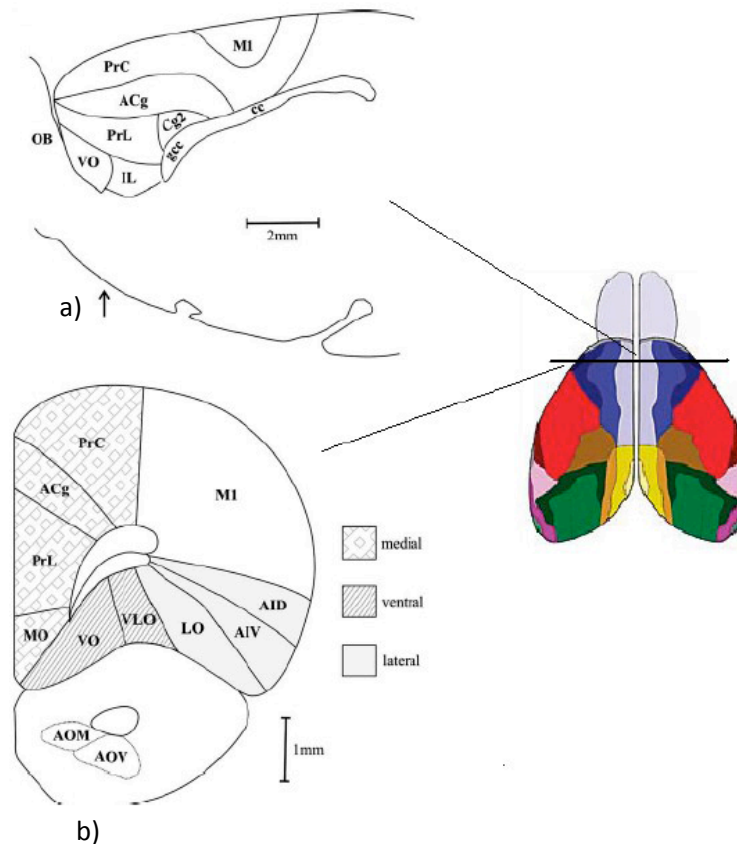


FIGURA 6. Sub-regiões do CPF de roedores. a) Secção sagital: 1 mm da linha média. b) Secção coronal unilateral: 3,5 mm anterior ao bregma. Os sombreados diferentes indicam as três principais divisões do CPF de roedores (medial, ventral e lateral). Abreviaturas: ACg, córtex cingulado anterior; AID, córtex agranular insular dorsal; AIV, córtex agranular insular ventral; AOM, núcleo olfatório anterior medial; AOV, núcleo olfatório anterior ventral; cc, corpo caloso; Cg2, área 2 do córtex cingulado; gcc, joelho do corpo caloso; IL, córtex infralímbico; LO, córtex orbital lateral; M1, área motora primária; MO, córtex orbital medial; OB, bulbo olfatório; PrL, córtex pré-límbico; PrC, córtex pré-central; VLO, córtex orbital ventrolateral; VO, córtex orbital ventral. (Extraído e traduzido de Jeffrey et al., 2004).

1.2.2. Funções do córtex pré-frontal

O CPF é uma área de associação terciária, multimodal, com função integrativa e estaria envolvido no “ciclo percepção-ação” (Fuster, 2001). Também possui um papel central no controle cognitivo e está envolvido na organização temporal do comportamento, mediando as contingências sensório-motoras através da integração da ação motora com as informações sensoriais recentes (Fuster, 2001). As conexões do CPF com outras áreas corticais e subcorticais sugerem que esta estrutura esteja relacionada a várias funções. Acredita-se que o CPF influencia no curso de atividades mentais humanas regulando processos de atividades complexas, tais como o planejamento, o controle comportamental e emocional do indivíduo (Fuster, 2001).

O CPF recebe projeções de áreas dos lobos occipital, parietal, e temporal, e também do giro cingulado. Essas conexões ajudam a compreender algumas de suas funções: nesse contexto, o CPF ventromedial possui conexões recíprocas com a amígdala, associadas ao processamento emocional, com o hipocampo, associado à memória, e áreas associativas temporo-visuais associadas ao processamento sensorial de alta ordem, assim como no CPF dorsolateral (Wood & Grafman, 2003). Essas vias neuronais aferentes e eferentes permitem que o CPF exerça um papel determinante nos estados de alerta, estresse e humor, bem como em funções específicas como a mediação da recompensa ou gratificação, atenção seletiva e memória (Robbins, 2000).

Para realizar todas essas funções citadas o CPF organiza e seleciona temporalmente essas atividades a fim de planejar, organizar e processar essas informações necessárias para gerar estratégias e ações futuras (Fuster, 2004). Assim as regiões do CPF funcionam de forma articulada a fim de gerenciar essas tarefas complexas, orquestrando múltiplas funções de alta complexidade, como por exemplo, no processamento da memória operacional (Figura 7) (Nakamura-Palacios, 2011).

O CPF medial (CPFm) é uma região que tem ganhado destaque em pesquisas por estar envolvido no monitoramento de conflitos, controle executivo, aprendizagem por recompensa, tomada de decisão e memória, e pesquisadores propõem que a principal função do CPFm é a de realizar associações entre contextos (tempo, espaço, emoção) e eventos, correlacionando com respostas adaptativas e subsequente aprendizado (Fuster, 2001; Rushworth et al., 2011; Euston et al., 2012).

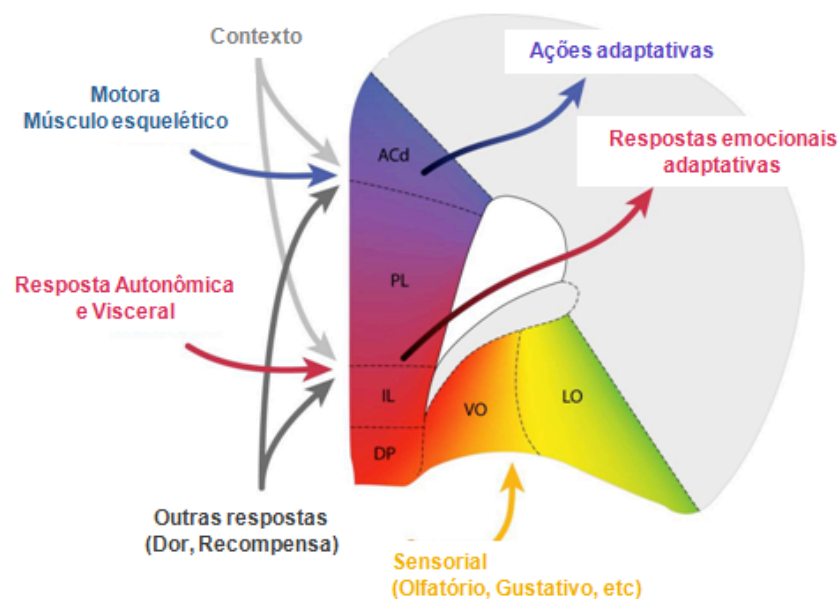


FIGURA 7. Ilustração dos sinais de entrada e saída das sub-regiões do CPF e suas respostas aos estímulos. Abreviações: ACd: cingulado anterior dorsal, PL: córtex pré-límbico, IL: córtex infralímbico, DP: córtex peduncular dorsal, VO: córtex orbital ventral e LO: córtex orbital lateral (Modificado e Traduzido de Euston, 2012).

1.2.3. O córtex pré-frontal e a memória operacional

Em 1960, foi proposto por Miller e colaboradores um termo de memória, a memória operacional (do Inglês *Working Memory*) que se refere ao armazenamento temporário e manipulação de informações necessárias para a execução de tarefas complexas como compreensão da linguagem, aprendizado e raciocínio. Porém com o passar do tempo essa definição de memória operacional ou “memória de trabalho” foi modificado e complementado ao longo do tempo por outros pesquisadores.

O conceito atual de memória operacional a define como um sistema contendo múltiplos sub-sistemas cognitivos ou um sistema de múltiplos componentes. Os modelos de memória operacional convergem na ideia de que múltiplos sub-sistemas trabalham em conjunto para ativar, manter e manipular uma informação relacionada a uma determinada tarefa durante a realização de testes cognitivos (Yuan et al., 2006 *apud* Nakamura-Palacios, 2011). Desse modo, ela tem sido descrita como um sistema multicomponente ou uma coleção de processos cognitivos distintos que provêm manutenção ativa da informação de diferentes modalidades sensoriais em um armazenamento temporário. Isto possibilita a manipulação, o processamento e a recuperação de memórias para serem convertidas em uma ação efetiva e apropriada após intervalos curtos (segundos), ou longos (minutos) em testes laboratoriais (Floresco e Phillips, 2001; Funahashi, 2006), e na cognição cotidiana (Gathercole & Baddeley, 2014). Assim, a memória operacional processa a informação momento a momento, e mesmo deficiências sutis nesta maquinaria podem significar deficiências substanciais na formação de ideias, raciocínio e planejamento (Gathercole & Baddeley, 2014).

No contexto da neurociência comportamental, existem vários modelos experimentais com o objetivo de avaliar a memória operacional em seus diversos aspectos, como exemplo, o labirinto radial de 8-braços (LR-8) (Figura 8), proposto inicialmente por Olton e Samuelson (1976).

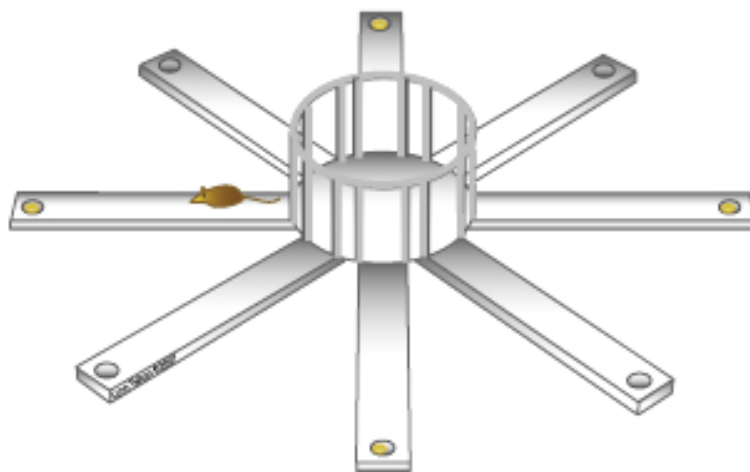


FIGURA 8. Ilustração do Labirinto Radial de 8 braços.

O LR-8 pode ser utilizado em protocolos experimentais em diferentes versões, com objetivo de avaliar funções cognitivas distintas, incluindo a memória operacional. Nessa perspectiva, o animal estando sob privação alimentar parcial é treinado a alcançar o reforço localizado no fim de cada braço do labirinto. Após algumas sessões de treinamento é introduzido um intervalo de retenção (retardo) entre um número de braços visitados, possibilitando um procedimento que é o utilizado no presente estudo, conhecido por teste com retardo (*"delayed task"*), ou retardo não pareado à amostra (*"delayed non matching to sample"* - DNMS), ou ainda de ganho na mudança de resposta com retardo (*"delayed spatial win shift"*) (Aujla e Beninger, 2001; Phillips et al., 2004). No paradigma do LR-8 o animal deverá evitar, após o retardo, a entrada em braços já visitados, pois se o fizer incorrerá em erro de desempenho e consequentemente em prejuízo de memória operacional. Nesse contexto, a memória operacional se refere à capacidade do animal em reter informações numa dada sessão de teste (Crusio & Schwegler, 2013).

Além da memória operacional, a memória de referência ou de procedimento também é avaliada no paradigma do LR-8; é um tipo de memória de longo prazo que armazena informações independentes de contexto, sendo necessário o registro de regras para a correta execução da tarefa. Seus mecanismos cerebrais são diferentes do processamento da memória operacional, no entanto eles se associam para o desempenho no LR-8 (Guitart & Roberts, 2015).

Várias áreas encefálicas parecem se relacionar com a memória operacional, direta ou indiretamente. Muitos estudos tentam desvendar as suas bases anatômicas (Funahashi, 2006), porém o que se sabe é a participação inegável do CPF no processo da memória operacional (D'Esposito, 2007). Em todas as espécies, a memória operacional é processada pela interação do CPF com o córtex entorrinal, parietal superior, cíngulo anterior e com o hipocampo (Izquierdo et al., 1998; Artiges et al., 2000). Estudos funcionais têm focado sua atenção mais precisamente para o CPFm, cuja lesão está consistentemente associada com disfunções cognitivas, particularmente aquelas que envolvem procedimentos com retardo, ou seja, a interposição de um intervalo de tempo (segundos, minutos ou horas) geralmente no meio da realização de uma tarefa cognitiva (Euston et al., 2012).

1.3. Sistema Glutamatérgico

1.3.1. Neuroquímica

Até meados da década de 40 o Glutamato (GLU) (Figura 9) era considerado um simples metabólito no ciclo de Krebs; porém em 1950 o pesquisador Weil-Malherbe demonstrou que esse aminoácido seria de grande importância nas funções cerebrais. Mas foi somente em 1954 que Hayashi propôs para o GLU um papel de transmissor sináptico no cérebro. Em 1960 Curtis e colaboradores verificaram que o GLU tinha capacidade de despolarizar e excitar neurônios individuais na medula espinhal de gatos, o que fez com que se levantasse a hipótese de o GLU ser de fato o principal neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (SNC).

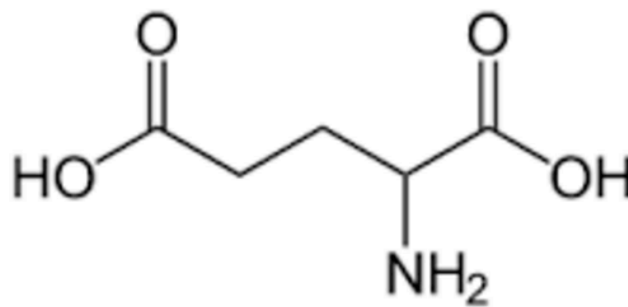


FIGURA 9. Estrutura química do Glutamato.

A neurotransmissão glutamatérgica (Figura 10), se dá por um processo neuronal onde há liberação de um mensageiro químico, no caso o GLU, por um neurônio pré-sináptico e subsequente reconhecimento deste aminoácido por receptores específicos nas células alvo na pós-sinapse (Nicholls, 1993).

Por ser um aminoácido que não atravessa a barreira hematoencefálica, o GLU é sintetizado no tecido nervoso a partir da glicose e outros precursores; as enzimas que metabolizam esses precursores estão localizadas nos neurônios e nas células da glia. Dentre essas enzimas temos as transaminases. O GLU fica armazenado em vesículas sinápticas onde poderá ser liberado de maneira dependente de Ca^{2+} ou como precursor do ácido gama aminobutírico (GABA) em sinapses inibitórias (Corona et al., 2005). Ao receber um potencial de ação os terminais pré-sinápticos

despolarizarão a membrana sináptica, com consequente influxo de Ca^{2+} através dos canais voltagem-dependente de cálcio (Ramadan et al., 2013). Em seguida, as vesículas se fundem à membrana plasmática neuronal e ocorre liberação do GLU para a fenda sináptica por exocitose. Quando liberado, o GLU se liga aos seus respectivos receptores e desencadeia suas ações nas sinapses neuronais (Tsai & Coyle, 2002).

O GLU participa de diversos processos bioquímicos, como no metabolismo energético, na síntese de ácidos graxos, na regulação dos níveis de amônia, bem como na composição de proteínas e peptídeos, e esses processos são cruciais no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, no aprendizado, na memória, na epilepsia, na isquemia neural, na tolerância e na dependência a drogas, na dor neuropática, na ansiedade e na depressão (Yernool et al., 2004; Stroeh et al., 2008; Featherstone et al., 2010).

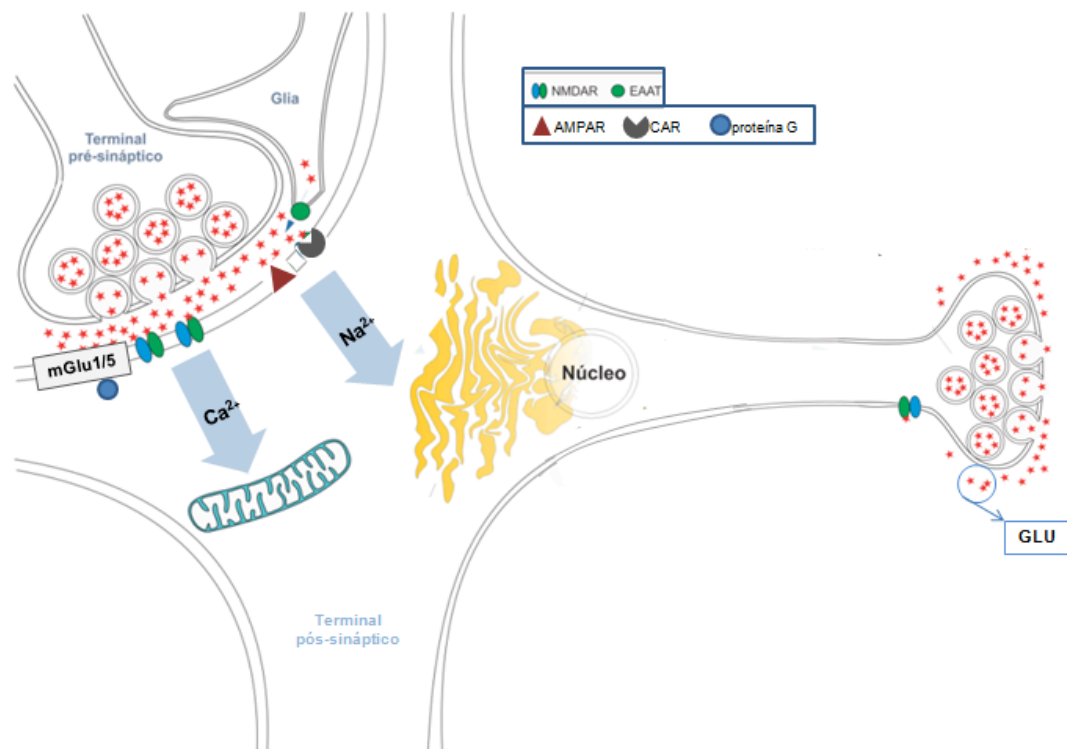


FIGURA 10. Neurotransmissão glutamatérgica: vesículas liberando GLU a partir de um terminal pré-sináptico. Ao se ligar aos seus receptores haverá um influxo de íons e/ou ativação de segundos mensageiros que participarão das sinapses neuronais. Também há participação dos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAAT) que são importantes para a homeostase do GLU extracelular, pois regula o tempo de concentração do mesmo na fenda sináptica. Abreviações: AMPAR – Receptor

do tipo AMPA; NMDAR – Receptor do tipo NMDA; CAR – Receptor do tipo Cainato. (Modificado de Pinto & Resende, 2014).

1.3.2. Receptores Glutamatérgicos

Como mencionado anteriormente, na membrana pós-sináptica o GLU promove suas ações através de interações com sítios de ligação específicos que são classificados em duas grandes famílias (Figura 11), os receptores metabotrópicos (mGluRs) e ionotrópicos (IGluRs).

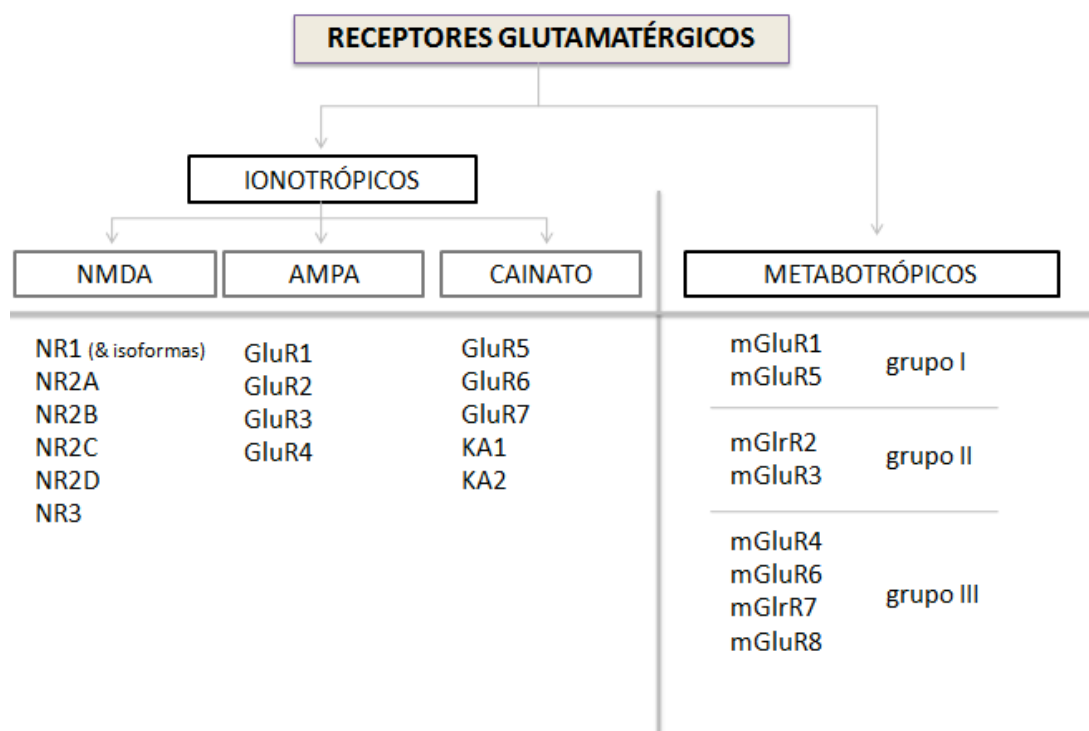


FIGURA 11. Famílias dos receptores do sistema glutamatérgico com suas respectivas subunidades.

Os receptores metabotrópicos (mGluR) (Figura 12) estão acoplados à proteína G e possuem uma característica de modular atividades intracelulares responsáveis pela produção de segundos-mensageiros, tais como AMP cíclico, diacilglicerol e inositol-3-fosfato, os quais podem ativar e/ou inibir diversos eventos de sinalização celular (Snyder et al., 2001). Esses receptores estão presentes em ambos os terminais (pré- e pós-sinápticos), mas também em células gliais, e quando ativados podem promover efeitos inibitórios ou excitatórios (Ferraguti et al., 2006). Devido à baixa disponibilidade de ligantes farmacológicos específicos, somente 8 receptores

metabotrópicos (mGluR1 a mGluR8) foram identificados e subdivididos em 3 grupos (I a III) de acordo com as vias de transdução que eles ativam (Sanacora et al., 2008).

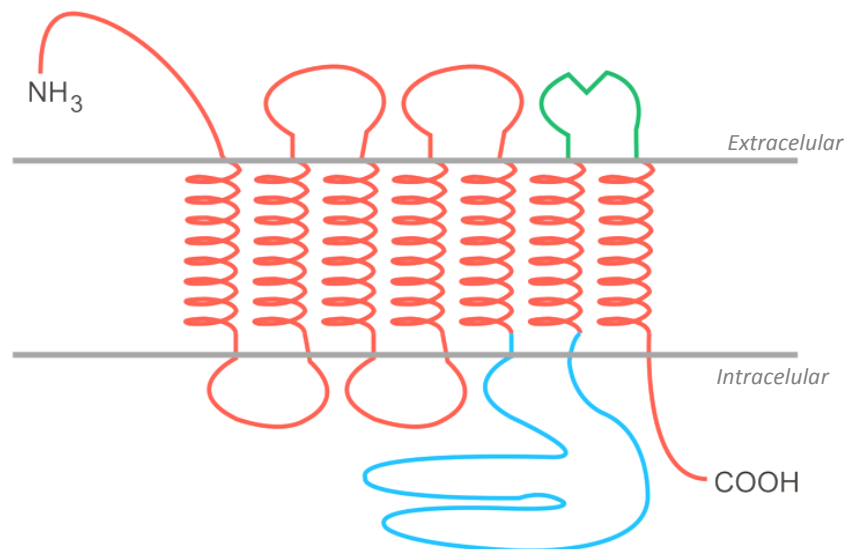


FIGURA 12. Ilustração da estrutura do receptor metabotrópico glutamatérgico, em verde o local de ligação do receptor ao agonista (GLU) e em azul a 3ª alça responsável pelo acoplamento com a proteína G.

Já os receptores ionotrópicos (iGluR) são canais iônicos que permitem a passagem de cátions específicos, e com isso a ativação desses receptores promove uma rápida despolarização da membrana sináptica gerando uma resposta excitatória. Eles são classificados de acordo com suas propriedades farmacológicas e fisiológicas em receptores do tipo NMDA e não-NMDA (AMPA e cainato), e são nomeados de acordo com a resposta aos seus agonistas.

Os receptores do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato; NMDAR) possuem uma estrutura complexa (Figura 13) com vários sítios de ligação de agentes endógenos, incluindo o íon zinco (Zn^{2+}), poliaminas, íon magnésio (Mg^{2+}), entre outros (Parsons et al., 2007). Esses receptores são heterotetrâmeros com uma combinação de suas subunidades: NR1, NR2, NR3. Os NMDAR são amplamente distribuídos no cérebro; encontram-se nos gânglios da base, cerebelo, medula espinhal, mas com maior expressão no hipocampo, tálamo e córtex (Riedel & Micheau, 2003). Outra característica desse canal é que possui uma cinética de abertura lenta e dependente de voltagem, e isso se deve à presença do íon Mg^{2+} em seu sítio de ligação que o

mantém inativo. Com a retirada desse íon os NMDARs ainda precisam se ligar, combinadamente, a moléculas de glutamato e/ou de glicina (co-agonista endógeno) para permitirem o influxo do íon Cálcio (Ca^{2+}), e às vezes o influxo de íon sódio (Na^+) (Lester et al., 2012; Seeburg et al., 2013). Por mais que a ativação desses receptores seja de forma lenta, quando comparado ao receptor do tipo AMPA (AMPA), eles perduram por mais tempo abertos mesmo após a liberação do glutamato do seu sítio de ação, o que gera um grande influxo de Ca^{+2} através do NMDAR. O aumento exagerado de Ca^{2+} dentro da célula pode desencadear o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e levar as células à morte por apoptose, fenômeno esse conhecido como excitotoxicidade (Gupta et al., 2013; Jia et al., 2015)

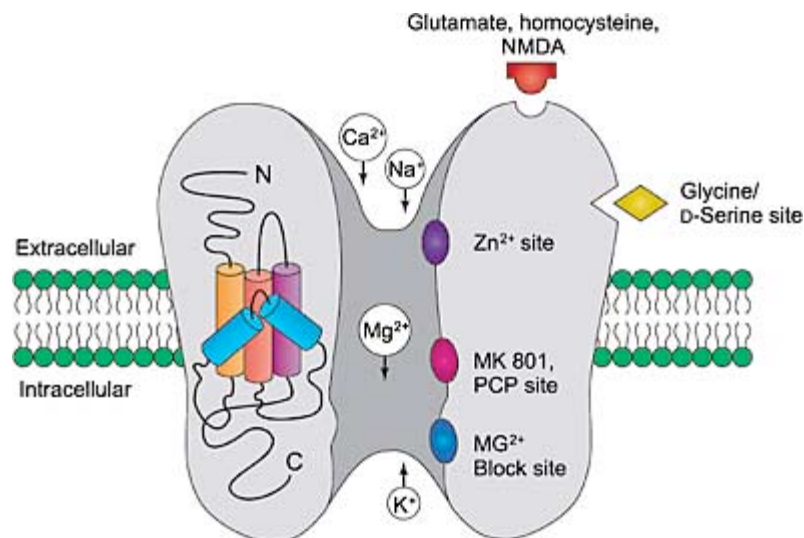


FIGURA 13. Os receptores do tipo NMDA possuem uma estrutura complexa com diferentes sítos de ligação para glutamato, glicina, Mg^{2+} , Zn^{2+} , poliaminas e a fenciclidina (PCP). Esse canal iônico é permeável ao Ca^{2+} e ao Na^+ (Park-Chung, 1997).

Os receptores do tipo AMPA (ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico; AMPAR) medeiam a neurotransmissão excitatória rápida, pois sua estrutura molecular é mais simples (Figura 14), o que faz com que tenham uma cinética rápida de ativação e inativação. Eles podem ser hetero ou homotetrâmeros e se combinam em diferentes estequiometrias para formar tetrâmeros funcionais; suas subunidades são: GluR1, GluR2, GluR3 e GluR4 (Man, 2011). Esses receptores são permeáveis ao Na^+ , o que desencadeia a despolarização da membrana neural; também são

permeáveis, com menos frequência, aos íons Ca^{2+} e potássio (K^+), porém alguns estudos têm descrito que os receptores que possuem a subunidade GluR2 são impermeáveis ao Ca^{2+} (Man, 2011). Os AMPARs estão amplamente distribuídos no SNC, com maior predomínio no hipocampo, córtex cerebral, gânglios da base e na camada molecular do cerebelo (Tomita et al., 2003; Renzel et al., 2013).

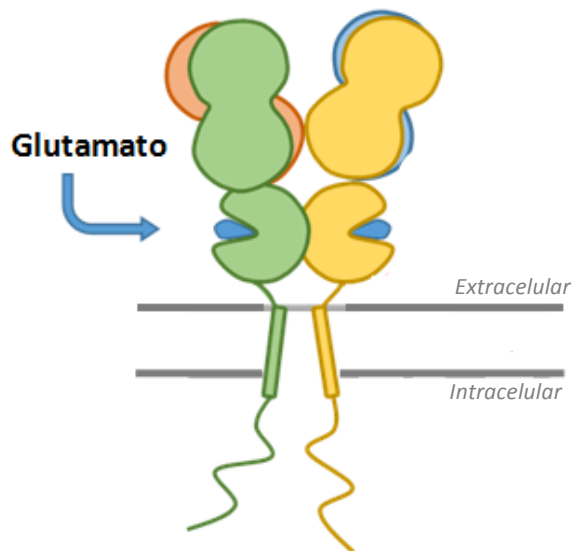


FIGURA 14. Ilustração do receptor tipo AMPA com suas subunidades formando um tetrâmero e o sítio de ligação do glutamato. (Extraído e Modificado de Constals & Choquet et al., 2015).

Pouco se sabe sobre os receptores do tipo Cainato (do inglês, *Kainate*) (Figura 15). Eles possuem uma estrutura tetrâmera combinando as subunidades: GluR5, GluR6, GluR7, KA1 e KA2. Como os AMPARs, os receptores do tipo cainato permitem o influxo de íon Na^+ , logo, também medeiam uma neurotransmissão rápida e são encontrados tanto nas células gliais quanto nos neurônios (Loane et al, 2014).

Importante destacar que todas essas funções combinadas, através da ação do GLU em seus respectivos receptores, são essenciais para as diversas funções cerebrais como a cognição, aprendizado, memória e na plasticidade neural (Danbolt, 2001; Yuen et al., 2011).

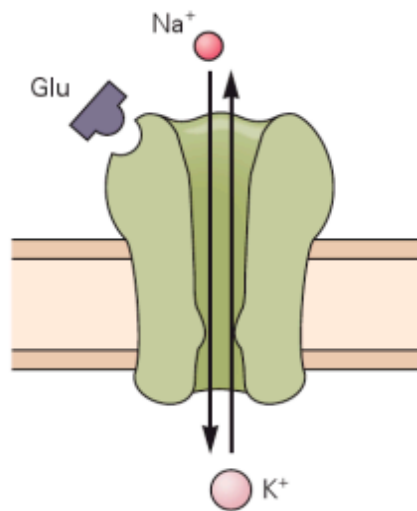


FIGURA 15. Ilustração do receptor do tipo Cainato.

1.3.3. Um novo antagonista AMPAérgico: Perampanel.

Foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 6 de Janeiro de 2014 para o tratamento adjuvante de crises epilépticas parciais, com ou sem generalização secundária, em pacientes com epilepsia com 12 anos ou mais, o primeiro fármaco da classe dos antagonistas não-competitivos do receptor tipo AMPA: Perampanel (Patsalos, 2015). Descoberto pelas equipes de pesquisa nos Laboratórios da *Eisai Co. Ltd.* (Tokyo), o Perampanel (Fycompa®) descrito quimicamente como 2-(2-oxo-1-fenil-5-piridina-2-il-1,2-dihidropiridina-3-il) benzonitrila (Figura 16) é rapidamente absorvido pelo trato gastrointestinal e aparentemente, pois ainda há estudos em andamento, possui uma biodisponibilidade em todos os tecidos (FDA, 2012). No homem o Perampanel (PRP) se liga às proteínas plasmáticas (glicoproteínas e albumina), e é metabolizado principalmente no fígado pelo sistema citocromo P450 via CYP3A4, por oxidação pela CYP3A5 ou por glicuronidação sequencial. As vias de eliminação são pelas fezes (48%) e em uma menor porcentagem pela urina (22%). O PRP tem uma meia-vida de 105 horas (Franco et al., 2013; Rheims & Ryvlin, 2013).

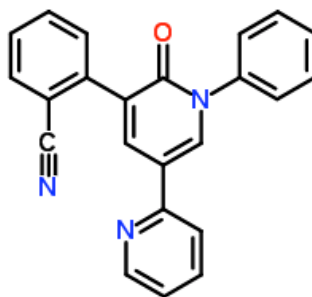


FIGURA 16. Estrutura química do fármaco Perampanel.

Estudos *in vitro* com cultura de células hipocâmpais demonstraram que o PRP inibiu as correntes evocadas pelo receptor do tipo AMPA, porém sem afetar os receptores do tipo NMDA (Figura 17). Esses dados demonstram a afinidade do fármaco ao AMPAR de forma não competitiva (Rogawski & Hanada, 2013).

Os estudos *in vivo* existentes são, principalmente, em modelos de crises epiléticas, onde o PRP prolongou de forma significativa a latência de crises num modelo de crises induzidas por hiper-excitação AMPAérgica, porém o mecanismo preciso pelo qual o perampanel exerce os seus efeitos antiepiléticos no ser humano ainda não foi completamente esclarecido (Chen et al., 2014). Também não há estudos que investigaram a ação do PRP em processos cognitivos e como se trata de um fármaco modulador do sistema glutamatérgico seria de grande importância um estudo que trouxesse dados sobre a participação do receptor tipo AMPA em processos cognitivos.

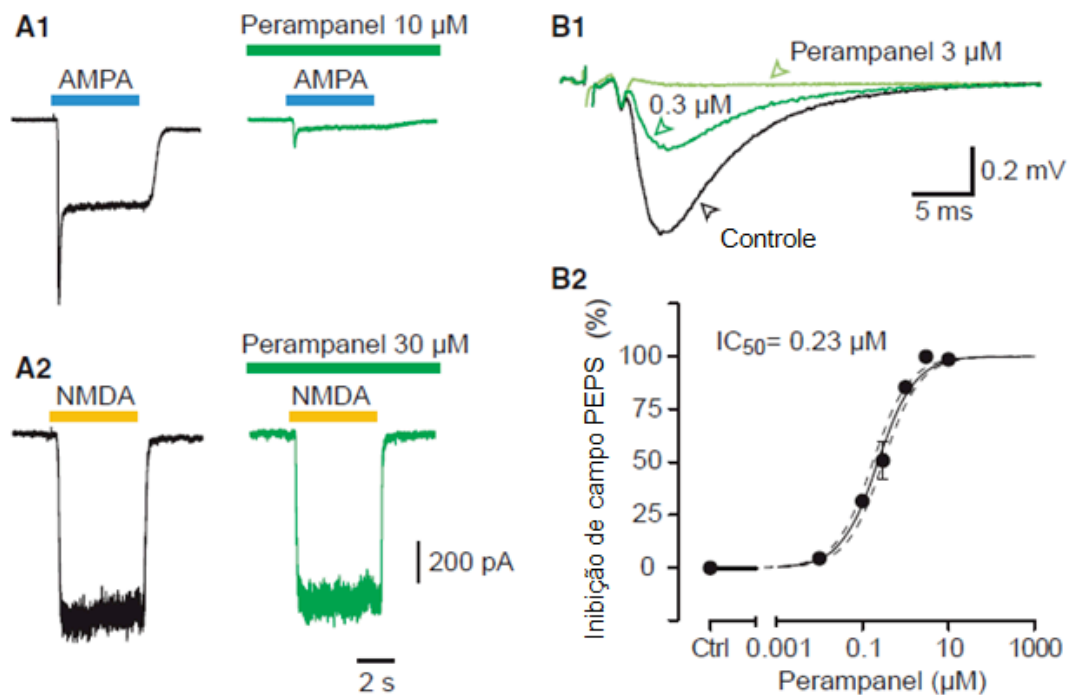


FIGURA 17. O Perampanel inibe as correntes evocadas do AMPAR em neurônios do hipocampo. (A) Inibição pelo PRP das correntes do receptor AMPA, mas não do tipo NMDA análises feitas por *whole-cell voltage-clamp* em cultura de neurônios hipocámpais. (A1) Correntes induzidas por perfusão com 100 μM AMPA foram quase completamente bloqueadas pela aplicação de 10 μM PRP. (A2) Correntes induzidas por 10 μM NMDA foram apenas minimamente afetadas por 30 μM de PRP. Observe que correntes do receptor AMPA exibem dessensibilização rápida, enquanto as correntes do receptor NMDA não. (B) Potenciais evocados foram registrados em fatias da região CA1 do hipocampo após a estimulação. (B1) A perfusão com PRP nas doses de 0,3 e 3 μM provocaram uma inibição dependente da concentração da resposta sináptica. (B2) Relação concentração-resposta da concentração máxima inibitória do PRP (IC₅₀). Abreviações: PEPS – Potencial Excitatório pós-sináptico. (Extraído e traduzido de Rogawski & Hanada, 2013).

Considerando então todos os estudos previamente publicados e citados, evidenciamos que ainda há lacunas relacionadas aos mecanismos subjacentes à ETCC, principalmente em condições basais, na ausência de patologias. Com o intuito de contribuir para entendimento de potenciais mecanismos envolvidos com este tipo de neuromodulação, testamos a hipótese de que o efeito EECC anódica *per se* (quando aplicada de modo crônico com corrente de 400 μA) é capaz de ser modulada pelo sistema glutamatérgico, via AMPAR, no desempenho de ratos no paradigma do LR-8. Utilizamos o método da EECC a fim de minimizar a perda e focalizar a corrente na região a ser estimulada.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar a modulação glutamatérgica pelo Perampanel na memória operacional espacial de ratos submetidos à estimulação epidural por corrente contínua de baixa intensidade.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da administração do Perampanel (1mg/kg) sobre a memória operacional de ratos desempenhando a tarefa de retardo de quatro horas no LR-8;
- Avaliar o efeito da estimulação epidural cortical por corrente contínua de baixa intensidade (400µA) sobre a memória operacional de ratos desempenhando a tarefa de retardo de quatro horas no LR-8;
- Avaliar os efeitos da interação entre o Perampanel e a estimulação epidural cortical por corrente contínua de baixa intensidade sobre a memória operacional de ratos desempenhando a tarefa de retardo de quatro horas no LR-8.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram empregados 53 ratos *Wistar*, machos, pesando aproximadamente 280-300 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). Os animais foram transferidos para a sala de manutenção do Laboratório de Ciências Cognitivas e Neuropsicofarmacologia (LCCNPF) do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (CCS/UFES) e mantidos em gaiolas individuais em um ambiente climatizado ($22^{\circ}\text{C} \pm 2$), em ciclo claro-escuro artificial de 12h (luzes acesas às 7 h), parcialmente privados de alimento e com água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados entre 7h e 12 horas. Os animais foram mantidos com o peso corporal acima de 80% do peso inicial, ajustado ao crescimento.

Neste estudo foram respeitados os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), que está em conformidade com normas internacionais de pesquisa envolvendo animais. Este trabalho foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CCS/UFES, sob o nº 004/2012.

3.2. Delineamento experimental

Os animais foram submetidos a sessões diárias de habituação e aprendizagem no LR-8. Após atingirem o critério de desempenho, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implante de eletrodo de estimulação epidural sobre o CPFm esquerdo.

Após completa recuperação, e para análise de desempenho de tarefa com retardo de quatro horas os 53 animais foram aleatoriamente distribuídos, primeiramente, em dois grupos – Experimento I:

- Grupo PRP (n = 26): animais submetidos à administração intraperitoneal (IP) do antagonista não-competitivo seletivo de receptor AMPA Perampanel (1mg/kg);
- Grupo VEH (n= 27): animais submetidos à administração IP de solução veículo (VEH).

Em um segundo momento, os mesmos animais foram subdivididos em quatro grupos para serem submetidos a 5 dias de sessões consecutivas de estimulação ativa (EECC) ou simulada (sham) – Experimento II:

- Grupo VEH/sham: Animais submetidos à sham e a administração IP de VEH.
- Grupo PRP/sham: Animais submetidos à sham e a administração IP de PRP;
- Grupo VEH/EECC: Animais submetidos à EECC de 400 μ A e a administração IP de VEH;
- Grupo PRP/EECC: Animais submetidos à EECC de 400 μ A e a administração IP de PRP;

Neste estudo foram empregadas amostras independentes para os diferentes tratamentos. Foi empregado um procedimento duplo-cego no qual o experimentador que realizava os procedimentos de aprendizagem no LR-8 desconhecia a qual grupo pertencia os animais, enquanto que o experimentador que realizava a estimulação e a administração IP da droga nos animais desconhecia os resultados do desempenho dos animais no LR-8, evitando assim qualquer viés de registro dos procedimentos (Figura 18). 24h após o último teste com retardo, os animais eram submetidos à eutanásia com sobredose anestésica de Ketamina 10% (75 mg/kg) e Xilazina 2%(10 mg/kg).

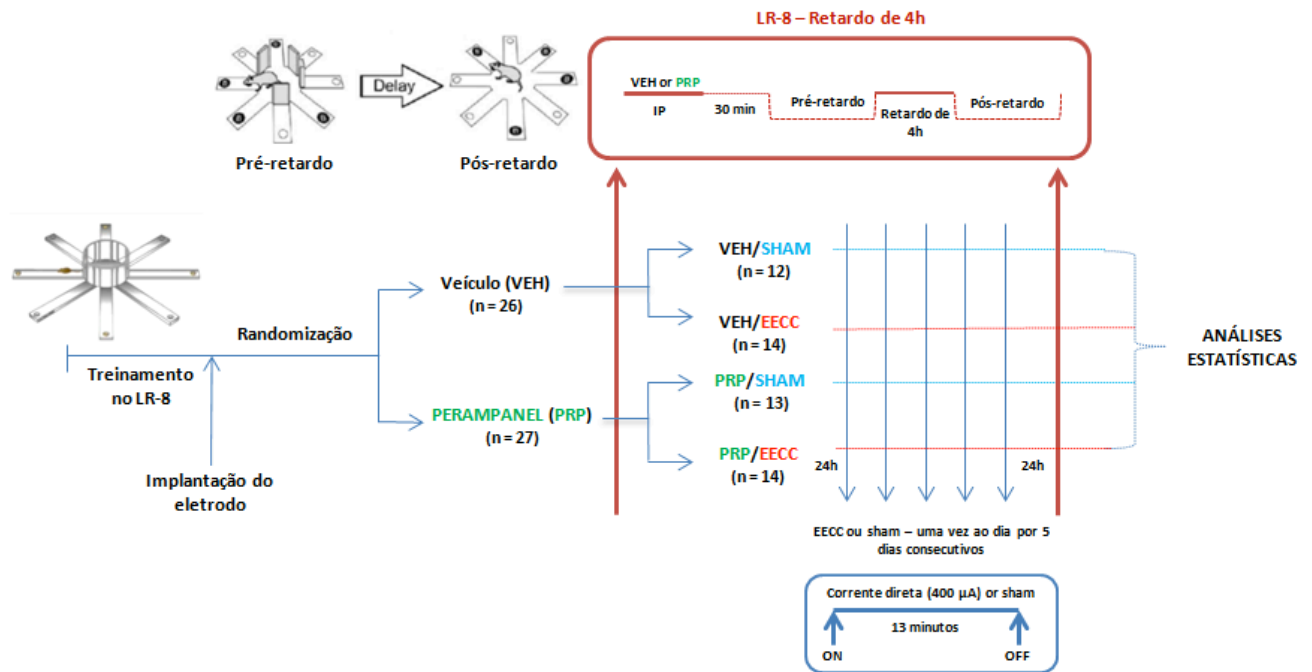


FIGURA 18. Diagrama do protocolo experimental.

3.3. Avaliação comportamental

3.3.1. Labirinto radial de 8 braços

Em 1976 Olton e Samuelson trouxeram uma proposta para avaliação da memória operacional espacial de animais através do labirinto radial de 8 braços (LR-8) (Figura 19). Esse método também tem sido utilizado para investigar os efeitos de diversas drogas sobre a função da memória operacional espacial em ratos (Nakamura-Palacios et al., 1997; De Melo et al., 2005), sugerindo sua eficiência como ferramenta nos estudos de farmacologia comportamental (Olton et al., 1987).

O LR-8 é construído em acrílico transparente, possuindo uma área central de base octogonal com 33 cm de diâmetro, de onde partem 8 braços simétricos e removíveis com 65 cm de comprimento, 10 cm de largura e paredes laterais de 4 cm de altura. No final de cada braço estão fixados receptáculos de acrílico preto com 11 cm de comprimento, 5 cm de largura e 3 cm de profundidade, onde o reforço (pedaços de

amendoim) é colocado. A plataforma central é constituída, em suas margens, de paredes de acrílico transparente de 30 cm de altura, nas quais se encontram portas deslizantes em forma de guilhotina que permitem o acesso aos braços. As portas estão presas a fios de nylon que ficam sob o controle do examinador, o qual se encontra à distância do labirinto para abertura e fechamento das mesmas. Placas de acrílico transparente com 20 cm de altura estão fixadas na entrada das portas para evitar que o animal atravessasse de um braço a outro.

O aparato é montado sobre uma armação de madeira compensada revestida de fórmica branca e sustentado por um suporte de metal a 100 cm do assoalho.

As sessões no LR-8 foram realizadas uma vez ao dia em dias consecutivos (5 vezes por semana), exceto finais de semana, até que atingissem o critério de aprendizagem previamente definido (0 ou 1 erro por sessão em três sessões consecutivas). Caso o animal não atingisse o critério em no máximo 20 sessões, o mesmo era excluído da amostra.

Neste estudo, a versão de labirinto radial utilizada para a avaliação de memória operacional foi a espacial. Por isso, no local onde se encontrava o labirinto foram colocados estímulos visuais distais fixos (figuras, armários, etc.) que favoreciam a orientação espacial do animal, e para evitar qualquer estímulo de estresse visual para o animal os experimentos eram realizados em um ambiente sob luz vermelha (40W).

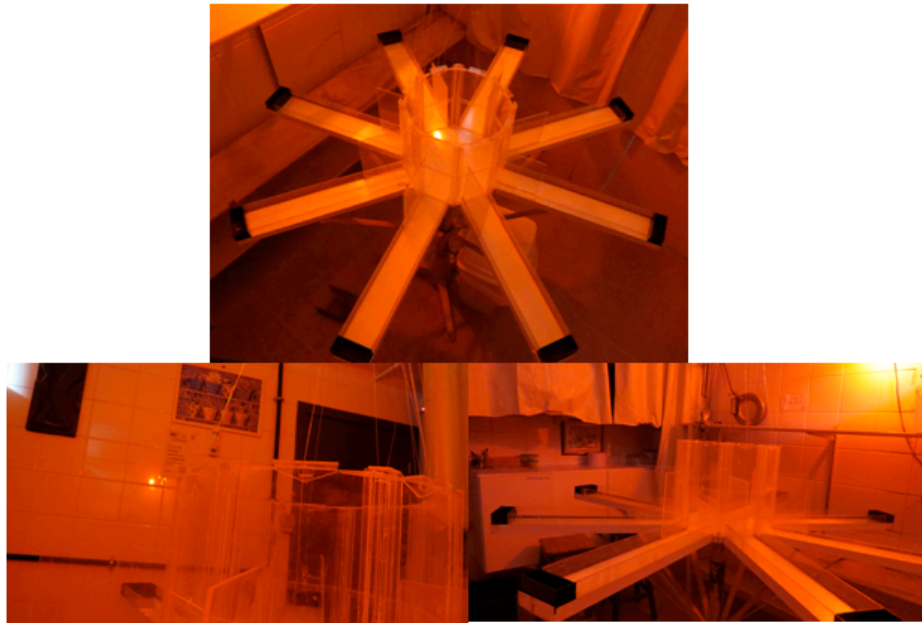


FIGURA 19. Sala de experimentação: Labirinto Radial de 8 braços.

3.3.1.1. Aquisição da tarefa.

Os animais foram submetidos a sessões de treinamento no LR-8 sob privação parcial de alimento como mencionado anteriormente, para possibilitar a aquisição das tarefas no decorrer dos treinos. Os pesos foram ajustados de acordo com o desempenho do animal nas seguintes fases para aquisição da tarefa:

Os procedimentos no LR-8 foram divididos em cinco fases, com a execução de apenas uma sessão diária e individual, com o período máximo de 10 min de permanência do animal no labirinto, por sessão. Após a entrada de cada animal o labirinto era totalmente limpo com álcool a 10%.

Fase I – Inicialmente, os animais eram posicionados na plataforma central do labirinto, com todas as portas de acesso aos braços abertas para livre exploração e habituação ao ambiente, durante 10 minutos por sessão, durante dois dias.

Fase II – Pedacos de amendoim (reforço) eram colocados nos receptáculos e os animais tinham livre acesso aos braços, para que localizassem e consumissem o reforço no final de cada braço, por um período de 10 minutos. Sempre que o reforço era consumido, um novo pedaco de amendoim era devidamente repostado no

receptáculo de origem, o que estimulava o animal a percorrer o labirinto. Essa fase é dependente da aprendizagem do animal na localização do reforço, e durava cerca de dois a três dias.

Fase III – O animal era posicionado na plataforma central e todas as portas eram abertas, permitindo a escolha de qualquer uma das oito portas. Ao entrar em um dos braços, todas as portas eram fechadas e, após ter encontrado e consumido o reforço do braço, o animal era novamente posicionado no centro do labirinto e todas as portas eram abertas, exceto a(s) que já tivesse(m) sido visitada(s) na sessão. Este procedimento foi feito sucessivamente até que o animal obtivesse os oito reforços em uma mesma sessão, no período máximo de 10 minutos por sessão.

Fase IV – Esta fase é considerada a aquisição da tarefa propriamente dita. Todas as portas eram abertas a cada reposicionamento do animal na plataforma central, após ter visitado qualquer um dos braços. Nesta condição, não ocorria reposição dos reforços e os animais deveriam aprender a não repetir braços já visitados, em um período de 10 minutos. A repetição de um braço já visitado era considerado erro de desempenho. Neste procedimento, considerou-se aprendizagem satisfatória quando o animal alcançava um desempenho de zero ou um erro por sessão, em três sessões consecutivas. Atingido esse critério, os animais eram submetidos à próxima fase (Figura 20).

Fase V – Nesta fase foi introduzido um intervalo de retenção (retardo) entre o quarto e quinto braços visitados, com o intuito de se testar a memória operacional espacial (Figura 21). A sessão de treinamento era dividida em duas partes: no pré-retardo quatro portas eram abertas aleatoriamente, previamente estabelecido pelo programa – *www.randomization.com* – tendo o cuidado de não escolher quatro braços consecutivos, para os animais alcançarem o reforço. Após terem visitado o quarto braço, eles eram levados até a gaiola-casa onde permaneciam por um período de 5 segundos. No pós-retardo os animais eram recolocados no centro do labirinto e estando todas as portas abertas eles deveriam entrar nos quatro braços ainda não visitados. A repetição de um braço visitado no pré ou no pós-retardo era considerado erro de desempenho e os animais eram treinados nesta fase até atingirem um critério de zero ou um erro para o pré e pós-retardo, por sessão, em três sessões

consecutivas. Atingido esse critério, os animais eram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de eletrodo.

Três dias após a recuperação cirúrgica, os animais eram submetidos a sessões de retardo de 5 s até que atingisse novamente o critério de 0 a um erro por sessão ao longo de três sessões consecutivas. Caso não atingisse o critério previamente estabelecido o animal era excluído do protocolo.



FIGURA 20. Animal executando a fase IV no LR-8.

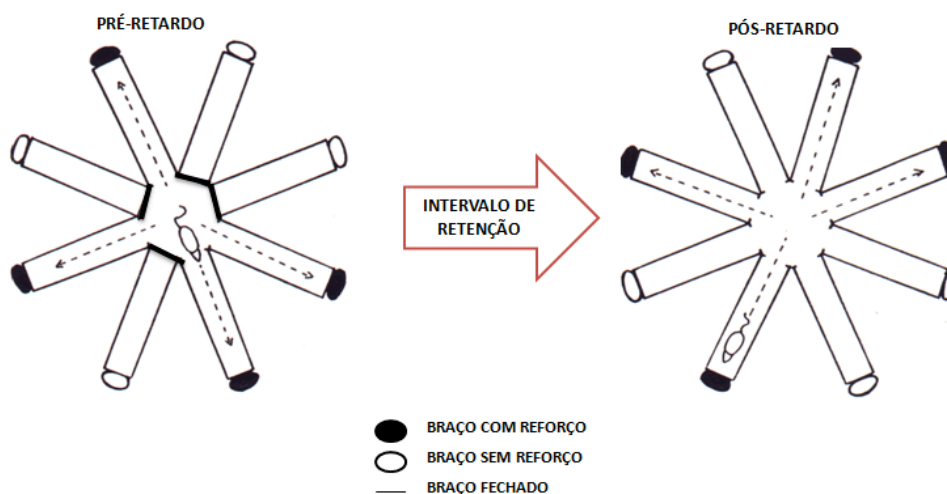


FIGURA 21. Diagrama experimental da fase de teste com retardo.

3.4. Cirurgia Estereotóxica

Após terem atingido o critério da fase V do treinamento, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotóxica para o implante do eletrodo de estimulação (ânodo) na região epidural acima do córtex pré-frontal medial esquerdo (CPFm esquerdo).

Os animais foram inicialmente anestesiados com Ketamina 10% (75 mg/kg) e Xilazina 2% (10 mg/kg), por via intraperitoneal (IP). Em seguida, a tricotomia foi realizada na parte superior da cabeça e no dorso do animal para posterior colocação dos eletrodos ânodo e cátodo, respectivamente.

Os animais foram fixados no aparelho estereotóxico (modelo 51600, Stoelting, IL, EUA), onde os seguintes procedimentos foram realizados: assepsia com álcool iodado na área cirúrgica, com injeção de um botão anestésico com 0,3 ml de solução de lidocaína a 1 % no tecido subcutâneo; ainda nessa região a pele e o tecido subcutâneo foram retirados para exposição da calota craniana na região do bregma. Após a localização do bregma as medidas estereotóxicas foram realizadas para definição e marcação do local da fixação do eletrodo/ânodo: + 2,5 mm anteroposterior, + 1 mm lateral-esquerdo em relação ao bregma sobre o córtex pré-frontal medial esquerdo de acordo com o atlas de coordenadas estereotóxicas (Paxinos e Watson, 1986).

Após a devida marcação do local de fixação do eletrodo foi realizada uma abrasão circular (5 mm de diâmetro) cuidadosa na superfície craniana com o auxílio de uma mini-furadeira com broca diamantada (Dremel Multipro + Kit, Stoelting, IL, USA) até a exposição da dura-máter, evitando-se que as meninges fossem perfuradas. A pequena cavidade circular foi preenchida com gel condutor (SuperVisc – High-Viscosity Electrolyte-Gel for active electrode, Germany) sobre a qual o eletrodo medindo 5 mm de diâmetro recortado a partir de eletrodos pré-confeccionados (Valutrode®, Neurostimulation electrodes, CF 3200, 3,2cm, redondo, USA) foi devidamente posicionado nessa cavidade. A ancoragem da prótese para sustentação do eletrodo era feita por dois dispositivos plásticos em arco que eram fixados bilateralmente nos ossos temporais, com o auxílio da mini-furadeira e por

resina acrílica auto-polimerizável de secagem rápida (polímero de metacrilato, JET, São Paulo, SP, Brasil) (Figura 22).

Ao término da cirurgia o animal era colocado em sua gaiola individual, mantido em local aquecido, com água e comida *ad libitum* por algumas horas até completa recuperação anestésica. Todos foram submetidos a três dias de tratamento com o anti-inflamatório não-esteroidal Flunixin Meglumine® 1,0 mg/Kg subcutâneo (uma vez ao dia), e cinco dias de tratamento com o antibiótico Enroflorxacina® 2,5% subcutâneo (uma vez ao dia).

Após três dias de recuperação os animais voltavam às sessões diárias de treinamentos no LR-8 para retorno à linha de base comportamental, ou seja, 0 a 1 erro por sessão, tanto no pré- como no pós-retardo, em 3 sessões consecutivas.



FIGURA 22. Cirurgia estereotóxica para implante de eletrodo.

3.5. Droga: Preparo e administração do Perampanel.

O Perampanel (E2007 *Drug Substance*, Lot. N° 15012059, Net. Wt. 2g, Eisai Co., Ltd.) é um antagonista seletivo não competitivo de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. Para esse protocolo, o fármaco foi diluído na proporção 1:1, onde 10mg do fármaco foi homogeneizado em duas gotas de Tween 80, e diluído em 10 mL de salina, a fim de obter uma concentração de 1 mg/mL, e era armazenado à temperatura de 4 °C, e a cada semana era preparada uma nova diluição da droga.

A definição da dose para esse estudo foi baseada em protocolos piloto realizados em nosso laboratório. Foram testadas as doses de 1 mg/kg, 3 mg/Kg e 6 mg/kg em camundongos, onde observou-se no teste de campo aberto a atividade locomotora dos animais; a dose de 6 mg/kg foi descartada pois os animais apresentavam uma sedação bastante pronunciada e não deambulavam no campo aberto. Em um segundo momento, as doses de 1 mg/kg e 3 mg/kg do Perampanel foram testadas em ratos *Wistar* no LR-8 utilizando os retardos de uma, quatro e dez horas. Os resultados demonstraram que na dose 3mg/kg os animais não desempenhavam os testes, ficando parados no labirinto, e na dose 1 mg/kg o melhor desempenho ocorreu no retardo de quatro de horas; nos demais retardos não foi observado muita diferença no desempenho quando comparado com grupo que recebeu VEH. E após a análise desses resultados optamos, para esse protocolo, utilizar a dose de 1 mg/kg e o teste de retardo de quatro horas.

Como solução veículo (VEH) utilizamos uma mistura de salina com duas gotas de Tween 80, que também era armazenado a 4°C.

A administração era realizada de forma aguda, pela via intraperitoneal (IP) e era iniciada na fase teste do retardo, como já descrito.

As administrações de PRP (1 mg/kg) ou VEH respeitavam um intervalo de 30 minutos antes do desempenho na tarefa com retardo de 4 horas no LR-8. Essa administração foi realizada em dois momentos: (1) Antes da EECC ou sham; (2) depois da EECC ou sham.

3.6. Estimulação Epidural por Corrente Contínua.

A estimulação epidural por corrente contínua direta de baixa intensidade foi realizada empregando-se um par de eletrodos de estimulação constituído de material autoadesivo. O eletrodo ânodo, com 5 mm de diâmetro, foi previamente implantado na região epidural sobre o CPF esquerdo em procedimento cirúrgico descrito previamente. O eletrodo catôdo, com 10 mm de diâmetro, era posicionado sobre a pele na região posterior direita da cabeça do animal próxima ao pescoço a cada sessão de estimulação (Figura 23).



FIGURA 23. Posicionamento dos eletrodos durante a estimulação.

A corrente elétrica foi liberada por um estimulador de corrente contínua empregando-se uma bateria de 9V, especialmente desenvolvido para esta finalidade (tDCS Demo Unit serial # 072208-03, NeuroQuestTherapeutics, EUA) sendo a saída máxima de corrente de 10 mA (Figura 24).

Uma corrente constante de pulso simples com intensidade de 400 μ A foi aplicada por 13 min uma vez ao dia durante 5 dias consecutivos. Na estimulação simulada (sham), os animais eram submetidos exatamente aos mesmos procedimentos cirúrgicos e de manipulação que o grupo de estimulação ativa, no entanto o estimulador não era acionado.

A passagem de corrente elétrica pelo eletrodo foi confirmada através da medição da corrente por um multímetro (Smart® DT-830B) antes de cada estimulação nos animais do grupo EECC (Figura 24).

As sessões de estimulação ativa ou sham foram realizadas por meio de contenção manual dos animais durante o período de estimulação de 13 min. Para atenuar os possíveis efeitos de estresse por contenção sobre o desempenho de tarefas no LR-8, ao iniciar a fase V os animais eram gentilmente contidos pelo experimentador por 13 min ao longo das sessões dessa fase de treinamento.

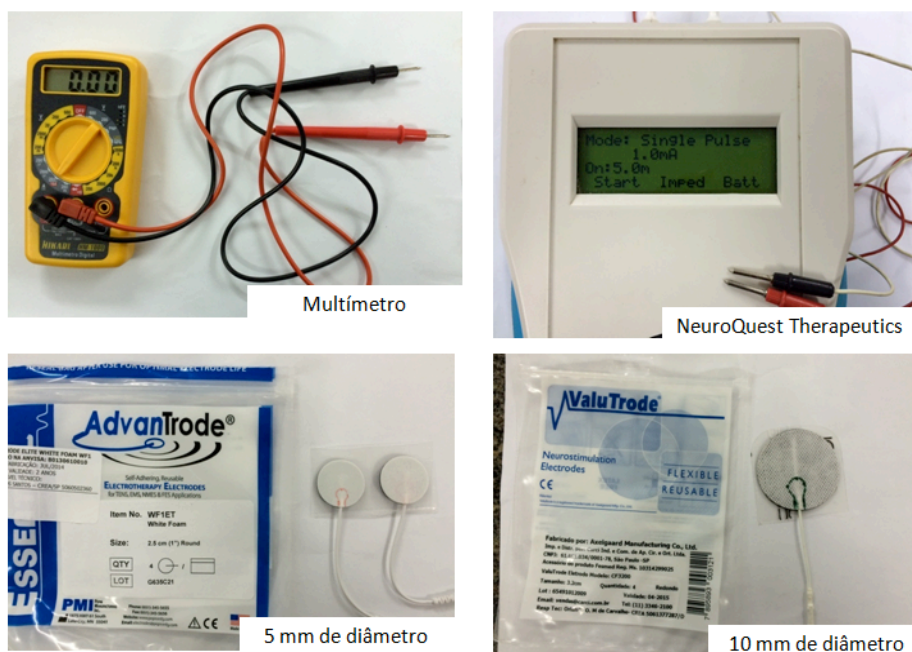


FIGURA 24. Materiais utilizados no protocolo para EECC ou sham.

3.7. Análise estatística

Ressaltamos que os animais foram randomizados por blocos (www.randomization.com), para o experimento I com dois grupos: (1) VEH e (2) PRP, e o experimento II com quatro grupos: (1) VEH/sham; (2) PRP/sham; (3) VEH/EECC; (4) PRP/EECC.

Os pesos corporais dos animais foram registrados semanalmente ao longo do protocolo experimental com o objetivo de que mantivessem entre 80 e 85% ajustado ao crescimento. Os pesos corporais foram expressos como média (em gramas) e erro padrão da média (e.p.m.). Foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas seguida de *post-hoc* de Tukey.

O desempenho dos animais na fase de aquisição de tarefa no LR-8 foi avaliado pela análise dos erros cometidos nas 10 últimas sessões de treinamento. Os erros foram definidos como a repetição de braços já visitados em uma mesma sessão de treinamento e são apresentados na forma de média de erros \pm erro padrão da média (e.p.m.). Foi empregada análise de variância (ANOVA) de uma via para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni para localização das diferenças estatisticamente significantes, tendo sido adotado um nível de significância de 5%. Ainda, utilizou-se uma análise de regressão linear para verificar se houve uma diminuição progressiva no número de erros.

No desempenho de tarefas com retardo de 5 segundos foram analisados os números de erros cometidos pelos animais e o tempo de permanência em cada braço no pré- e pós-retardo. Para ambos os dados foi empregado ANOVA de uma via para medidas repetidas com *post-hoc* de Bonferroni. Aqui também foi realizada uma análise de regressão linear.

No experimento I foram considerados os erros de desempenho e tempo gasto em cada braço no pré- e pós-retardo de 4 horas. Para essas análises foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes. Já no experimento II, também foram considerados os erros cometidos e tempo gasto pelos animais no pré- e pós-retardo de 4 horas. Para essas análises foi utilizada análise de variância (ANOVA) de duas

vias com dois fatores independentes (a estimulação cerebral – EECC ou sham como um fator) e o antagonismo AMPA (PRP ou VEH) como o outro fator, e os erros de desempenho como a variável dependente. Ainda, foi realizado o teste *t* de Student para a comparação entre dois grupos independentes.

Para todas as análises foi empregado um nível de significância para $P < 0,05$. O software SPSS 17.0 (Inc, EUA) e o software *Graphpad Prism* 5.0 (La Jolla, CA 92037, EUA) foram utilizados para as análises estatísticas e representações gráficas.

4. RESULTADOS

4.1. Pesos corporais durante as fases de treinamento.

Os animais foram pesados antes do início do treinamento e semanalmente ao longo das cinco fases de treinamento no LR-8 a fim de que os mesmos mantivessem um peso corporal no mínimo entre 80 a 85% do peso inicial.

A ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes [$F(4,208) = 6,059$; $P < 0,0001$] na comparação dos pesos corporais entre as fases de treinamento. O teste de Tukey revelou que houve uma diminuição do peso corporal dos animais ao longo das sessões II, III e IV comparados ao peso inicial e à fase I de treinamento. Essa diminuição é esperada, uma vez que a privação de alimentos nessas fases iniciais é intensificada já que o grau de motivação é importante para que os animais aprendam a tarefa de forma satisfatória. Uma vez atingido o critério de aprendizagem, a privação era diminuída e os animais voltavam a adquirir peso de acordo com a idade, o que se pode verificar nos dados da Fase V (Figura 25).

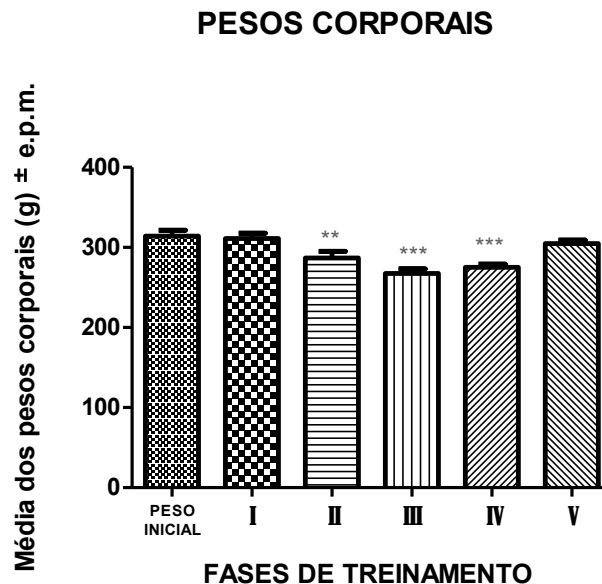


FIGURA 25. Média dos pesos corporais (g) \pm e.p.m. durante as fases de treinamento no LR-8. ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$ comparado ao peso inicial e ao da Fase I pela ANOVA de uma via para medidas repetidas com *post-hoc* de Tukey.

4.2. Aquisição da tarefa

4.2.1. Fase IV: antes da introdução do retardo de 5 segundos.

A fase IV é a fase de aquisição da tarefa propriamente dita, onde o animal realiza a tarefa de entrar uma única vez em cada braço do LR-8. Todos os animais ($n = 53$) apresentaram melhora gradativa do desempenho no decorrer das últimas 10 sessões de treinamento. A análise de regressão linear [$Y = 2,06 - 0,147X$; $r = 0,34$; $F(1,518) = 66,24$; $P < 0,0001$] demonstrou uma diminuição progressiva do número de erros, atingindo o critério pré-estabelecido para a aprendizagem.

A ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação do número de erros cometidos entre as sessões de treinamento [$F(9,468) = 7,76$; $P < 0,0001$]. O teste de Bonferroni mostrou que as três últimas sessões apresentaram uma diminuição significativa ($P < 0,001$) do número de erros em relação as duas primeiras sessões (Figura 26).

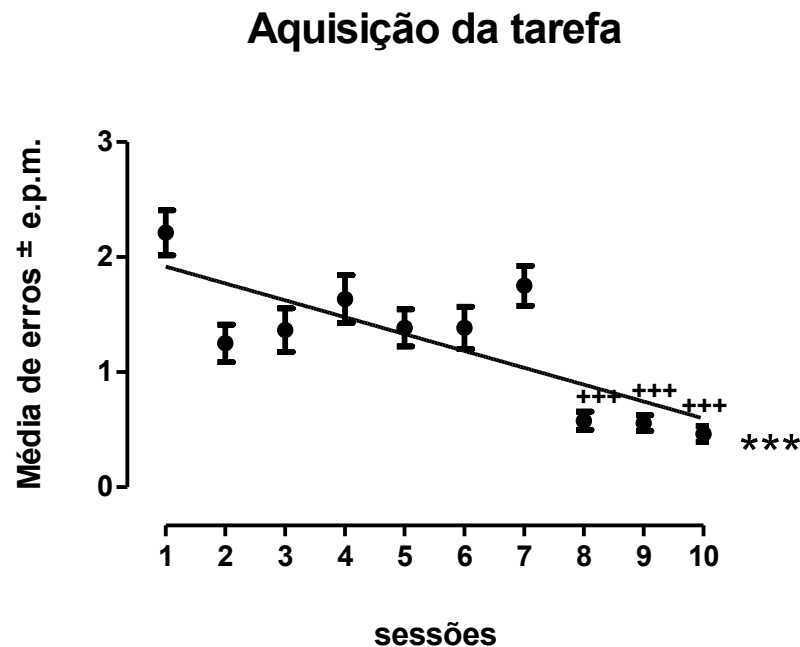


FIGURA 26. Média de erros \pm e.p.m. nas 10 últimas sessões de treinamento na fase IV no LR-8 ($n = 53$). $+++p < 0,0001$ quando comparado a primeira sessão pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $***p < 0,0001$ pela análise de regressão linear.

Quanto à análise de tempo gasto (segundos) em cada braço, a ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes ao longo do treinamento [$F(9,52) = 102,6$; $P < 0,0001$], como demonstrado na Tabela 1. O teste de Bonferroni para comparações múltiplas demonstrou que o tempo gasto em cada braço foi significativamente menor nas sessões 8, 9 e 10 quando comparadas à sessão 1.

TABELA 1. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. pelos animais ($n = 53$) em cada braço visitado durante as fases de treinamento no decorrer das últimas 10 sessões.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)			
Sessões	Média \pm e.p.m.	Sessões	Média \pm e.p.m.
1	31,12 \pm 0,63	6	25,42 \pm 0,43
2	26,71 \pm 0,34	7	23,26 \pm 0,49
3	26,23 \pm 0,70	8	21,71 \pm 0,42 ***
4	25,35 \pm 0,86	9	17,70 \pm 0,37 ***
5	25,17 \pm 0,78	10	12,22 \pm 0,33 ***

*** $P < 0,0001$ quando comparado à sessão 1 de treinamento pelo teste de Bonferroni.

4.2.2. Fase V: após a introdução do retardo de 5 segundos

Nesta última fase da aquisição da tarefa os animais também devem atingir um bom desempenho, ou seja, zero ou um erro nas últimas três sessões de treinamento, tanto no pré-retardo quanto no pós-retardo, após a introdução do intervalo de retenção (retardo) de 5 segundos.

A análise de regressão linear demonstrou que houve uma diminuição progressiva do número de erros no pré- [$Y = 0,42 - 0,077X$; $r = 0,22$; $F(1,26) = 12,54$; $P < 0,001$] (Figura 27 à esquerda) e no pós-retardo [$Y = 1,96 - 0,344X$; $r = 0,45$; $F(1,26) = 65,93$; $P < 0,0001$] (Figura 27 à direita) no decorrer das últimas 5 sessões.

A ANOVA de uma via para medidas repetidas detectou diferenças estatisticamente significantes na comparação dos números de erros cometidos tanto no pré- como no

pós-retardo. O teste de Bonferroni localizou estas diferenças nas comparações entre a primeira e as duas últimas sessões no pré-retardo [$F(4,204) = 4,017$; $P = 0,0037$] e, ainda, entre a primeira e as três últimas sessões no pós-retardo [$F(4,208) = 18,07$; $P < 0,0001$).

Retardo de 5s

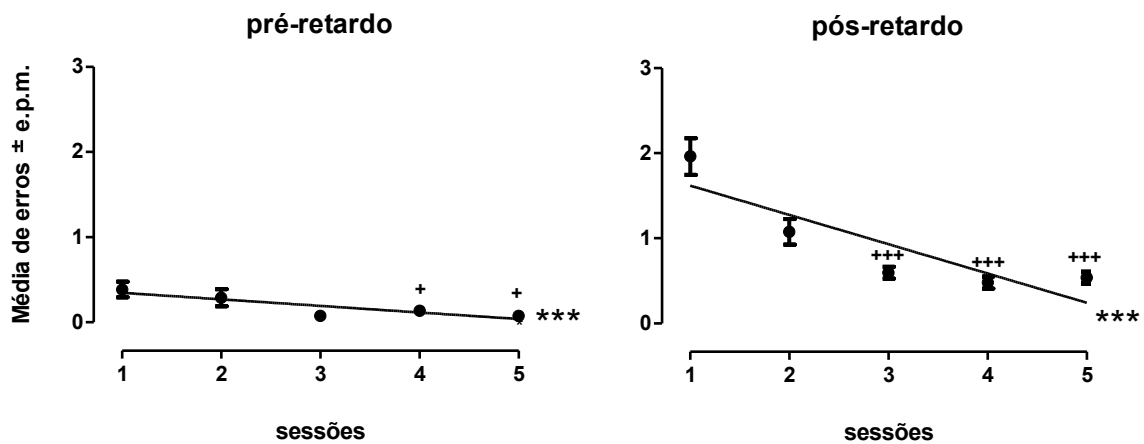


FIGURA 27. Média de erros \pm e.p.m do desempenho dos animais durante o pré- (à esquerda) e pós-retardo (à direita), ao longo das últimas 5 sessões ($n = 53$). $^+p < 0.05$, $^{+++}p < 0.0001$ quando comparado a primeira sessão pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni; $^{***}p < 0.0001$ pela análise de regressão linear.

A ANOVA de uma via para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes tanto no pré- quanto no pós-retardo de 5 segundos com relação ao tempo gasto em cada braço visitado (Tabela 2).

TABELA 2. Média do tempo gasto (segundos) \pm e.p.m. pelos animais (n = 53) em cada braço visitado no pré- e pós-retardo de 5 segundos no decorrer das ultimas 5 sessões de treinamento na fase V.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Sessões	pré-retardo	pós-retardo
1	14,21 \pm 1,16	15,21 \pm 1,31
2	11,74 \pm 0,82	15,93 \pm 1,40
3	12,81 \pm 1,16	15,09 \pm 1,62
4	15,62 \pm 1,33	19,12 \pm 1,88
5	16,44 \pm 1,48	19,21 \pm 1,27

4.3. Experimentos

4.3.1. Experimento I – Receptores AMPA e memória operacional.

O experimento I apresenta dados referentes ao desempenho dos animais na realização dos testes com retardo de 4 horas no LR-8 após administração aguda IP do perampanel (1 mg/kg) ou VEH.

Não foram detectadas diferenças no pré-retardo de 4 horas no LR-8. Entretanto o teste *t* de Student detectou diferenças significantes entre os grupos no pós-retardo de 4 horas no LR-8 [*t*(51) = 3,27; *P* = 0,0019] (Figura 28, à direita). Animais que receberam administrações agudas IP de PRP na dose de 1 mg/kg apresentaram um maior número de erros (*P* < 0,01) quando comparados ao grupo controle (VEH).

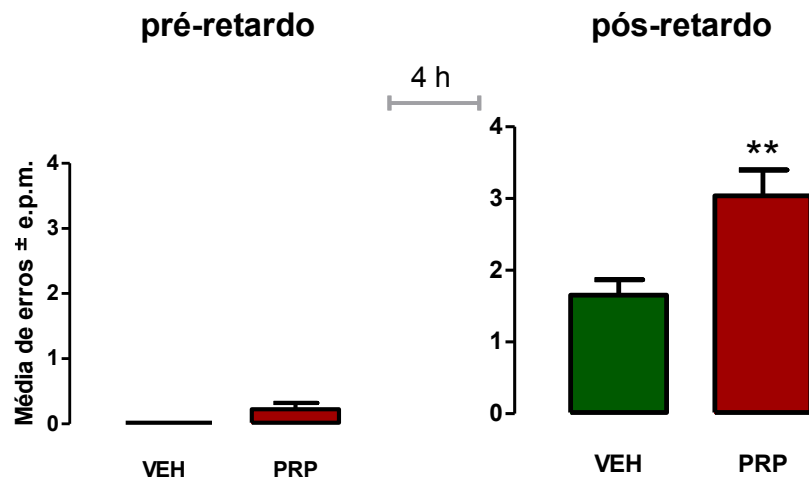


FIGURA 28. Efeitos da administração aguda de perampanel (n=27) na dose de 1 mg/kg ou do veículo (n=26) sobre o desempenho (média de erros \pm e.p.m.) de animais no pré- (à esquerda) e pós-retardo (à direita) de 4h no LR-8. ** $P < 0,01$ comparado ao grupo VEH.

O teste *t* de Student não detectou diferenças estatisticamente significantes no tempo gasto em cada braço após a administração de PRP na dose de 1 mg/kg ou VEH tanto no pré- quanto no pós-retardo de 4 horas no LR-8 (Tabela 3).

TABELA 3. Efeitos da administração aguda de Perampanel na dose de 1 mg/kg (n=27) ou do veículo (n=26) sobre o tempo gasto (em segundos) em cada braço visitado no pré- e pós-retardo de 4h de testes realizados no LR-8.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Tratamento	pré-retardo	pós-retardo
VEH	12,38 \pm 0,84	13,77 \pm 0,79
PRP	13,54 \pm 0,50	12,31 \pm 0,99

4.3.2. Experimento II – Receptores AMPA, EECC anódica e memória operacional

De modo a avaliar o papel do AMPAR sobre a modulação pré-frontal induzida pela estimulação direta por corrente contínua sobre a memória operacional espacial, animais submetidos a EECC anódica (400 μ A por 13 minutos) sobre o CPFm esquerdo ao longo de cinco dias consecutivos, desempenharam tarefas com retardo de 4 horas no LR-8 com os receptores AMPA antagonizados pelo perampanel (PRP/EECC). Essa condição foi comparada a animais tratados com perampanel, porém após a estimulação simulada (PRP/sham), e também com animais tratados com solução veículo após a estimulação simulada (VEH/sham) e estimulação epidural por corrente contínua repetitiva (VEH/EECC). Esses resultados são apresentados na figura 29.

A ANOVA de duas vias não detectou diferenças significantes no desempenho de pré-retardo de 4 horas de animais desempenhando tarefas no LR-8 entre os diferentes grupos de tratamento. Entretanto, a ANOVA de duas vias mostrou uma interação significativa entre estimulação cerebral versus antagonismo AMPA [$F(91, 46) = 9,0$, $p = 0,0043$, $\eta^2 = 0,164$] no desempenho de tarefas com retardo de 4 horas no LR-8. Testes t pos-hoc revelaram que animais que receberam veículo após EECC repetitiva ao longo de cinco dias consecutivos (VEH/EECC) cometeram significativamente menos erros [$t(23) = 2,053$, $p = 0,05$] quando comparados a animais que receberam solução veículo após estimulação simulada (VEH/sham) no desempenho tarefas com retardo de 4 h no LR-8. Os animais do grupo VEH/EECC também cometeram, de forma significativa, menor número de erros [$t(24) = -3,78$, $p = 0,001$] no pós-retardo de 4 horas quando comparados ao grupo que recebeu perampanel após EECC (PRP/EECC). Um dado interessante a destacar é que grupo PRP/EECC apresentou um desempenho no pós-retardo de 4 horas semelhante ao grupo VEH seguido de estimulação simulada (VEH/sham). Finalmente, o desempenho de pós retardo de 4 horas de animais do grupo PRP/sham mostrou de forma significativa menor número de erros [$t(23) = -2,40$, $p = 0,025$] quando comparados a animais que recebem perampanel após estimulação epidural por corrente contínua ao longo de 5 dias consecutivos (PRP/EECC).

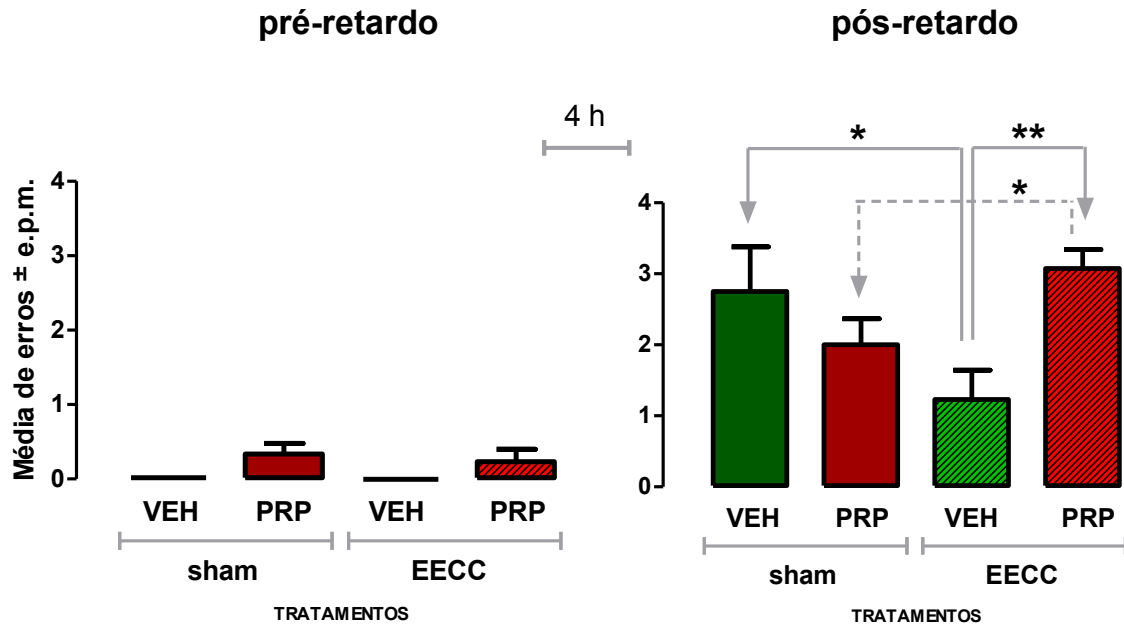


FIGURA 29. Efeitos do perampanel (PRP) após repetitivas estimulações epidurais (uma vez por dia, durante cinco dias consecutivos) de corrente elétrica contínua anódica (EECC: 400 mA durante 13 minutos) sobre o córtex pré-frontal medial (PRP/EECC, $n = 13$) ou após estimulação simulada (PRP/sham, $n = 12$), comparado ao tratamento com o veículo (VEH) depois da EECC (VEH/EECC, $n = 13$) ou depois de tratamento simulado (VEH/sham, $n = 12$) no desempenho da tarefa de retardo de 4h no LR-8. * $P \leq 0,05$ quando comparado com VEH/sham (para VEH/EECC) ou PRP/sham (para PRP/EECC), ** $P = 0.001$ quando comparado com VEH/EECC (para PRP/EECC).

Não houve alterações estatisticamente significantes no tempo gasto em cada braço visitado nos diferentes tratamentos tanto no pré- quanto no pós-retardo de 4 horas de animais submetidos a testes no LR-8 (Tabela 4).

TABELA 4. Efeitos dos diferentes tratamentos (VEH/sham, PRP/sham, VEH/EECC e PRP/EECC) sobre o tempo gasto, em segundos, em cada braço visitado no pré- e pós-retardo de 4 horas de testes realizados no LR-8.

Tempo gasto em cada braço (média em segundos \pm e.p.m.)		
Tratamentos	pré-retardo	pós-retardo
VEH/sham	10,55 \pm 0,84	12,38 \pm 0,84
PRP/sham	12,69 \pm 0,87	19,21 \pm 1,61
VEH/EECC	11,30 \pm 0,82	18,15 \pm 1,68
PRP/EECC	18,50 \pm 0,79	12,50 \pm 1,17

5. DISCUSSÃO

Estudos neurofarmacológicos já evidenciam a participação dos receptores do tipo NMDA em processos cognitivos. Como exemplo, temos um estudo que utilizou o MK-801, um bloqueador de NMDAR de alta afinidade (Vishnoi et al., 2015), que provocou um bloqueio na indução da LTP *in vitro* e *in vivo* (Housh, et al., 2014) levando a prejuízos em testes de avaliação de aprendizagem e memória (van der Staay et al, 2011). Em outros experimentos utilizando antagonistas NMDAR os autores observaram que os processos cognitivos, como aprendizagem e memória, são totalmente prejudicados por esse antagonismo, o que sugere que os demais receptores glutamatérgicos não seriam capazes de suprir o bloqueio de NMDAR, o que o torna alvo central nas discussões do seu papel principal nessas atividades cognitivas (Wang et al., 2006; Snigdha et al., 2010; McAllister et al., 2015).

Porém, no presente estudo utilizamos uma única dose de PRP (1 mg/kg), um antagonista seletivo não-competitivo do receptor tipo AMPA, e comprovamos que o bloqueio do receptor *per se* prejudica a memória operacional espacial em animais ($p < 0,01$) no teste de retardo de 4 horas no LR-8, o que sugere uma importante participação desse receptor nessa função cognitiva. Vale ressaltar que a função do NMDAR não é alterada pela ação do PRP no sistema glutamatérgico (Rogawski & Hanada, 2013), logo, se a memória operacional fosse dependente exclusivamente do NMDAR a mesma não deveria ter sido influenciada pela ação desse fármaco. Assim, a memória de trabalho espacial de longo prazo parece depender, também, de receptores do tipo AMPA.

O perampanel é um antagonista seletivo não-competitivo de receptores glutamatérgicos do tipo AMPA. Atualmente ele é aprovado em mais de 35 países (membros da União Européia, EUA, Canadá e Suíça) como uma terapia adjuvante para o tratamento de crises parciais com ou sem generalização secundária em pacientes com epilepsia com idades a partir de 12 anos (18 anos no Canadá) (Hanada, 2014). Este é o primeiro fármaco antiepilético aprovado para inibir a excitação das membranas pós-sinápticas através da inibição seletiva de receptores de AMPA (Hanada, 2014).

Assim, a maioria dos elementos de ensaios pré-clínicos tem sido dirigidos para avaliar efeitos antiepilépticos do PRP (Hanada, et al., 2011; Hanada, 2014), e até o momento não há estudos que mostram os seus efeitos sobre o desempenho cognitivo, especialmente na memória operacional. Assim, este é o primeiro estudo sobre os efeitos do PRP na memória operacional espacial de roedores.

Estudos anteriores demonstraram que o bloqueio não-seletivo de receptores do tipo AMPA trouxe dados inconclusivos sobre a participação do AMPAR em processos de memória operacional espacial em tarefas no LR-8 (Li et al., 1997), já que o mesmo interrompeu a memória de trabalho espacial apenas quando combinado com um antagonista NMDAR não-competitivo (Li et al., 1998). No entanto, micro-injeções no hipocampo dorsal de antagonista AMPAR (NBQX) foi prejudicial, não só para a memória operacional espacial, mas também para processos de consolidação e de retenção do aprendizado (Yoshihara & Ichitani, 2004).

Estudos recentes têm investigado a participação de receptores do tipo AMPA em processos de aprendizagem e memória, sendo específicos ao ponto de analisar o envolvimento das subunidades de AMPARs nesses mecanismos. Sanderson e colaboradores (2008) publicaram em uma revisão o perfil de expressão da subunidade GluR1 em hipocampo de camundongos *knockout* e selvagens para GluR1, diante de uma tarefa de aprendizagem, extinção e memória espacial de longo prazo no labirinto aquático de Morris. O resultado foi significativo somente na avaliação de memória espacial de longo prazo, em que os animais *knockout* para GluR1 tiveram prejuízo no desempenho da tarefa quando comparado ao grupo controle, o que sugere que nesse modelo experimental de plasticidade sináptica, a qual fornece subsídios para os mecanismos de memória de longo prazo, requer a participação dessa subunidade do receptor glutamatérgico do tipo AMPA (Sanderson et al., 2008; Freudenberg et al., 2013). Outra subunidade que tem sido estudada é a GluR2, pelo fato de conferir ao receptor uma impermeabilidade aos íons cálcio (Wright & Vissel, 2012). Essa subunidade também tem sido investigada em processos de plasticidade sináptica, pois o influxo de íons cálcio é essencial tanto para a indução da potenciação de longo prazo quanto para uma sinapse melhorada (Wright & Vissel, 2012). Esses estudos sugerem que o mecanismo subjacente da memória operacional espacial exige o envolvimento do AMPAR, em

particular de circuitos corticais, dados esses que são consistentes com os nossos resultados.

Esses circuitos corticais envolvem não só a participação do CPF, como também do hipocampo e estriado. Essas estruturas estão interligadas por circuitarias neuronais e estão envolvidas na aprendizagem procedural (estriado), na organização de sequências espaciais e tomada de decisão (CPF), e em ações retrospectivas e prospectivas (hipocampo) (Myhrer et al., 2003; Goto & Grace, 2006). Essa circuitaria envolve projeções dopaminérgicas, glutamatérgicas e colinérgicas (Myhrer et al., 2003), porém a glutamatérgica é a mais acionada, uma vez que as aferências sensoriais não são provenientes diretamente da periferia, mas de conexões com regiões corticais e subcorticais, das quais recebe informações em relação ao meio externo através de todas as modalidades sensoriais processadas inicialmente por outras vias primárias. Além disso, o CPF recebe informações sobre o estado emocional do indivíduo e o *status* autonômico relacionado a memórias relevantes de eventos prévios que tenham sido consolidados e armazenados (Figura 30) (Barbas, 2000; Powell & Voeller 2004). A eficácia das atividades associativas dessas regiões é necessária para o aprendizado e a memória em todas as fases de treinamento no LR-8.

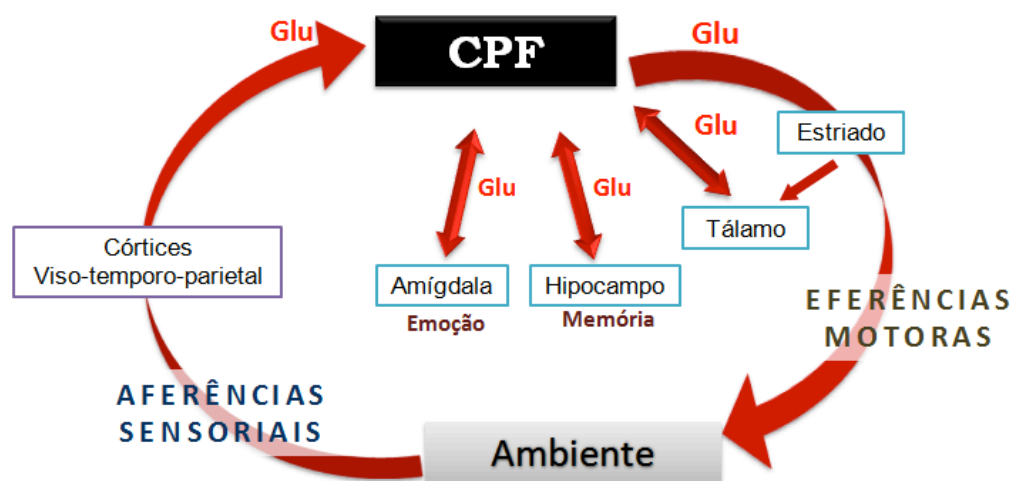


FIGURA 30. Representação esquemática da circuitaria glutamatérgica do CPF, conexões com o ambiente externo, através das vias aferentes e eferentes, assim como com áreas corticais e subcorticais.

Em um segundo momento desse estudo, avaliamos a modulação glutamatérgica pela EECC anódica a fim de investigar os possíveis mecanismos subjacentes da estimulação elétrica por corrente contínua. Em nosso estudo, utilizamos a corrente de 400 μ A aplicada acima da duramáter durante 13 minutos por 5 sessões consecutivas, e apesar das diferenças metodológicas do nosso protocolo, os dados encontrados corroboram com os resultados dos estudos prévios (de Souza-Custódio et al., 2012). O grupo VEH/EECC apresentou menor número de erros ($p \leq 0.05$) no desempenho na tarefa de pós-retardo de 4 horas quando comparado ao grupo VEH/sham e ao grupo PRP/EECC ($p = 0.001$). E de modo inesperado, o grupo PRP/sham teve um melhor desempenho quando comparado ao grupo PRP/EECC ($p \leq 0.05$). Nossos dados sugerem uma interação entre os tratamentos (Perampanel *versus* EECC), pois os animais que receberam o PRP seguido de EECC anódica apresentaram uma piora no desempenho do teste de retardo no LR-8 quando comparado aos demais grupos. Assim, nossa hipótese é de que o efeito da EECC anódica, nesse desenho experimental, seja dependente do sistema glutamatérgico, já que a EECC não foi capaz de reverter o prejuízo da memória operacional causado pelo PRP, e além disso acentuou esse déficit.

Para realização dessa etapa, os animais foram cuidadosamente contidos por 13 minutos para que os procedimentos sham ou EECC fossem realizados uma vez por dia durante 5 dias consecutivos. Portanto, embora essa contenção tenha sido por um curto período, o tratamento para a estimulação cerebral pode ter causado um leve estresse, e por isso o número de erros no desempenho do pós-retardo de 4 horas tenha aumentado no grupo VEH/sham ($2,75 \pm 2,18$ DP) quando comparado com o grupo VEH antes do procedimento com contenção ($1,42 \pm 1,08$ DP).

Exposições agudas e crônicas a condições de estresse afetam o desempenho cognitivo, podendo facilitar ou prejudicar particularmente as habilidades cognitivas pré-frontais (Cerqueira et al., 2007; Arnsten, 2009; Arnsten, 2015). Cerqueira et al (2007) expôs ratos a diversos fatores de estresse imprevisíveis (água fria, vibração, contenção, superlotação e exposição a uma corrente de ar quente) por uma hora e uma vez por dia durante três ou seis dias, a fim de avaliar as memórias operacional e de referência no labirinto aquático de Morris. Os autores observaram que três dias

de exposição ao estresse foi prejudicial para a memória de referência, mas seis dias de exposição ao estresse prejudicou a memória de referência e operacional.

Yuen et al (2012) demonstraram que ambos os receptores glutamatérgicos, AMPA e NMDA, foram suprimidos no córtex pré-frontal de animais expostos a estresse por contenção aplicada de forma repetitiva. Eles observaram que os animais expostos ao estresse de imobilização por 5 ou 7 dias mostrou uma redução significativa na quantidade das subunidades GluR1 (subunidade de AMPARs) e NR1 (subunidade de NMDARs), em neurônios do CPF e essa degradação seria via ação proteolítica (ubiquitina-proteassoma). A redução dessas subunidades gera déficits nos processos cognitivos mediados pelo CPF (Yuen et al., 2012).

Assim, todos os animais expostos a esta condição (estresse por contenção) no presente estudo, independentemente se por procedimentos sham ou EECC, podem ter tido mudanças nas funções do AMPARs induzidas pelo estresse de contenção. Isso poderia explicar o por que do bloqueio AMPA pelo PRP parecer deslocar um pouco seus efeitos para a melhoria do desempenho pós-retardo em animais expostos ao procedimento sham. Este efeito e seus mecanismos subjacentes merecem ser investigados, uma vez que podem ser de importância clínica para o tratamento de condições mentais que são consequência e/ou influenciadas por estresse.

Por outro lado, a EECC anódica sobre o CPF medial esquerdo apresenta um efeito de melhorar a memória operacional espacial, o que já era esperado, pois esse efeito facilitatório já foi investigado em estudos anteriores do nosso laboratório (De Souza-Custódio et al., 2012), e esse efeito também tem sido relatado, por outros pesquisadores, com estudos no homem (Fregni et al., 2005; Andrews et al., 2011).

Ainda não se sabe como a estimulação elétrica de baixa intensidade promove esse efeito na memória operacional. Segundo Andrews et al (2011), uma hipótese para a melhora desse desempenho, em indivíduos saudáveis submetidos à estimulação anódica, pode estar relacionada ao mecanismo de LTP. Floel e Cohen (2010) também sugerem que a estimulação cortical em combinação a treinamentos cognitivos pode otimizar o desempenho via LTP em tarefas que demandam processamentos cognitivos. De fato, sabe-se que a ETCC fortalece as conexões

sinápticas induzindo LTP, e os efeitos em longo prazo da técnica dependem de modificações na eficácia dos receptores de canais iônicos (Liebetanz et al., 2002; Nitsche et al., 2003) bem como acompanhada por modificações em nível celulares e moleculares (Nitsche et al., 2008; Pelletier & Cicchetti, 2015).

O envolvimento dos receptores de NMDA na plasticidade motora induzida por ETCC está muito bem documentada (Liebetanz et al., 2002; Nitsche et al., 2004), mas são poucas as evidências do envolvimento de receptores de AMPA na modulação induzida por estimulação de corrente contínua, em especial no córtex pré-frontal e no processamento da memória.

Os dados obtidos com o presente trabalho corroboram com outros estudos que salientam o envolvimento do sistema glutamatérgico nos mecanismos da estimulação elétrica (Nitsche et al., 2004; Lugon et al., 2015). A administração do PRP, mesmo que de forma aguda, prejudicou a memória operacional e a estimulação anódica crônica (5 dias consecutivos) na corrente de 400 μ A por 13 minutos no CPFm esquerdo de animais não foi capaz de reverter esse prejuízo. Esses resultados sugerem que um dos mecanismos subjacentes à estimulação seja dependente de receptores do tipo AMPA.

Inúmeros artigos científicos têm sido publicados sobre os efeitos eletrofisiológicos e comportamentais benéficos da estimulação por corrente contínua e isso tem instigado vários autores a investigarem potenciais mecanismos subjacentes a tais efeitos em protocolos experimentais com animais (Binder et al., 2013; Podda et al., 2016).

Adicionalmente, em relação aos mecanismos moleculares, um estudo realizado com fatias de córtex motor primário de camundongos, mostrou que a liberação de BDNF (fator neurotrófico derivado do cérebro), envolvido na plasticidade neuronal, e a ativação do seu receptor TrKB são mediadores chave dos efeitos da estimulação, pois em camundongos *knockout* para BDNF e TrKB a LTP promovida pela estimulação foi totalmente abolida (Fritsch, 2010). Outro estudo investigou os efeitos da ETCC anódica na região referente ao hipocampo com corrente de 350 μ A por 20 minutos, em camundongos submetidos a testes de aprendizado e memória no

labirinto aquático de Morris, e os autores observaram uma melhora no desempenho cognitivo dos animais associada a um aumento da expressão de BDNF no hipocampo (Podda et al., 2016).

Assim, a EECC repetitiva anódica poderia ter aumentado o perfil de expressão do AMPAR no CPF medial através do mecanismo de LTP, porém, devido ao estresse de imobilização pode ter ocorrido uma supressão de AMPARs, como discutido acima, ou gerado uma condição através do reforço das sinapses nesta região cortical, melhorando o desempenho da memória de trabalho espacial de longo prazo.

No entanto, o bloqueio AMPAR parece neutralizar e/ou reverter completamente o efeito facilitador sobre a memória de trabalho espacial longo prazo produzido pelas estimulações elétricas por corrente contínua repetitivas, pois o número de erros no pós-retardo do grupo EECC/PRP se igualou ao desempenho do grupo controle (VEH/sham). Este resultado demonstra claramente que os receptores AMPA estão criticamente envolvidos na modulação induzida pela estimulação de corrente direta na mediação pré-frontal da memória de trabalho.

Há limitações neste estudo que devem ser mencionados. Em primeiro lugar, apenas uma dose de PRP foi investigada neste estudo. A dose de 1 mg/kg foi escolhida tendo em conta estudos publicados anteriores que mostraram que esta dose era eficaz em ensaios pré-clínicos. Além disso, executamos alguns estudos-pilotos em camundongos e ratos, e observamos que uma dose mais elevada (3 mg/kg) induzia efeitos sedativos de forma que os animais não conseguiriam desempenhar adequadamente as tarefas no labirinto radial, não nos permitindo aumentar a dose de modo a se ajustar em uma curva dose-efeito satisfatória. Doses mais baixas de PRP poderiam ser consideradas, mas este estudo teve como objetivo procurar uma dose eficaz deste antagonista AMPAR que poderiam interagir com o procedimento de estimulação cerebral. Portanto, estudos futuros com outras doses serão necessários para compreender melhor os efeitos do PRP na memória operacional espacial. Em segundo lugar, os mecanismos subjacentes exatos envolvidos na interação dos tratamentos do antagonismo AMPAR e da EECC na memória operacional espacial precisam ser investigados de uma forma mais detalhada, como

por exemplo a investigação do perfil de expressão proteica das subunidades dos AMPARs. O CPF, hipocampo e estriado do cérebro dos animais deste estudo foram removidos, para dar continuidade ao estudo. No entanto, entendemos que esta investigação merece se estender a outros receptores do sistema glutamatérgico e suas subunidades.

Em resumo, demonstramos até o momento que o PRP, um antagonista seletivo não-competitivo do AMPAR, prejudica a memória operacional espacial de longo prazo de animais submetidos a tarefas com retardo de 4 horas no LR-8. De maneira importante, mostramos que o antagonismo AMPAR bloqueou a facilitação induzida pela EECC repetitiva anódica no CPF medial esquerdo na memória operacional espacial de longo prazo. Estes resultados sugerem que a memória espacial e a modulação cognitiva pré-frontal pela estimulação elétrica por corrente contínua são altamente dependentes da atividade dos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA.

6. CONCLUSÕES

Os achados deste estudo permitem as seguintes conclusões:

- O Perampanel, antagonista seletivo não competitivo de receptor tipo AMPA, prejudica a memória operacional espacial de ratos em tarefas com retardo de 4h no LR-8;
- A EECC anódica sobre o CPF medial esquerdo ao longo de cinco dias consecutivos não foi capaz de reverter os prejuízos causados pelo Perampanel na memória operacional espacial de ratos em tarefas com retardo de 4h no LR-8;
- O Perampanel bloqueou a facilitação induzida pela EECC anódica na memória operacional espacial de ratos em tarefas com retardo de 4h no LR-8;
- Os dados sugerem que os efeitos da estimulação elétrica por corrente contínua direta envolvem o sistema glutamatérgico, em especial, os receptores do tipo AMPA, na memória operacional espacial de duração prolongada avaliada no LR-8.

7. REFERÊNCIAS

- Accornero, N., Voti, P. L., La Riccia, M., & Gregori, B. (2007). Visual evoked potentials modulation during direct current cortical polarization. *Experimental Brain Research*, 178(2), 261-266.
- Adams, R. D., Victor, M., Ropper, A. H., & Daroff, R. B. (1997). Principles of neurology. *Cognitive and Behavioral Neurology*, 10(3), 220.
- Albert, D. J. (1966). The effect of spreading depression on the consolidation of learning. *Neuropsychologia*, 4(1), 49-64.
- Albert, D. J. (1966). The effects of polarizing currents on the consolidation of learning. *Neuropsychologia*, 4(1), 65-77.
- Alves, Natércia Carvalhal. Modulação glutamatérgica pela memantina na memória operacional espacial em ratos sob estimulação epidural cortical por corrente contínua de baixa intensidade. 2013, 163 folhas. Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo.
- Andrade, P., Noblesse, L. H., Temel, Y., Ackermans, L., Lim, L. W., Steinbusch, H. W., & Visser-Vandewalle, V. (2010). Neurostimulatory and ablative treatment options in major depressive disorder: a systematic review. *Acta neurochirurgica*, 152(4), 565-577.
- Andrews, S. C., Hoy, K. E., Enticott, P. G., Daskalakis, Z. J., & Fitzgerald, P. B. (2011). Improving working memory: the effect of combining cognitive activity and anodal transcranial direct current stimulation to the left dorsolateral prefrontal cortex. *Brain stimulation*, 4(2), 84-89.
- Arnsten, A.F. (2015). Stress weakens prefrontal networks: molecular insults to higher cognition. *Nat Neurosci*. 18(10): p. 1376-85.

Arnsten, A.F. (2009). Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci*. **10**(6): p. 410-22.

Artiges, E., Salamé, P., Recasens, C., Poline, J. B., Attar-Levy, D., De la Raillère, A., & Martinot, J. L. (2000). Working memory control in patients with schizophrenia: a PET study during a random number generation task. *American Journal of Psychiatry*, *157*(9), 1517-1519.

Barbas, H. (2000). Connections underlying the synthesis of cognition, memory, and emotion in primate prefrontal cortices. *Brain research bulletin*, *52*(5), 319-330.

Binder, S., Berg, K., Gasca, F., Born, J., & Marshall, L. (2013). OP 1. Boosting sleep slow oscillations by oscillatory transcranial direct current stimulation enhances memory consolidation in rats. *Clinical Neurophysiology*, *124*(10), e54-e55.

Bindman, L. J., Lippold, O. C. J., & Redfearn, J. W. T. (1962). Long-lasting changes in the level of the electrical activity of the cerebral cortex produced by polarizing currents. 584-585.

Boggio PS, Zaghi S, Villani AB, Fecteau S, Pascual-Leone A, Fregni F (2010). Modulation of risk-taking in marijuana users by transcranial direct current stimulation (tDCS) of the dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC). *Drug Alcohol Depend*, *112*:220-225.

Boggio PS. Efeitos da estimulação transcraniana por corrente contínua sobre memória operacional e controle motor. 2006. 123f. Tese de Doutorado em Psicologia, USP, São Paulo, 2006.

Brunoni, A. R., Nitsche, M. A., Bolognini, N., Bikson, M., Wagner, T., Merabet, L., & Ferrucci, R. (2012). Clinical research with transcranial direct current stimulation (tDCS): challenges and future directions. *Brain stimulation*, *5*(3), 175-195.

Cerqueira, J. J., Mailliet, F., Almeida, O. F., Jay, T. M., & Sousa, N. (2007). The prefrontal cortex as a key target of the maladaptive response to stress. *The Journal of Neuroscience*, *27*(11), 2781-2787.

Chen, C. Y., Matt, L., Hell, J. W., & Rogawski, M. A. (2014). Perampanel inhibition of AMPA receptor currents in cultured hippocampal neurons. *PloS one*, 9(9), e108021.

Collingridge, G. L., Kehl, S. J., & McLennan, H. T. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *The Journal of physiology*, 334(1), 33-46.

Constals, A., Penn, A. C., Compans, B., Toulmé, E., Phillipat, A., Marais, S., & Choquet, D. (2015). Glutamate-induced AMPA receptor desensitization increases their mobility and modulates short-term plasticity through unbinding from Stargazin. *Neuron*, 85(4), 787-803.

Corona J.C, Tapia R. (2005). Mecanismos de Neurodegeneración. Mensaje Bioquímico. 29: 17-28.

Crusio, W. E., & Schwegler, H. (2013). Radial maze. *Behavioral Genetics of the Mouse: Genetics of Behavioral Phenotypes*. Cambridge University Press, Cambridge, 299-303.

Curtis, D. R., & Watkins, J. C. (1960). The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *Journal of neurochemistry*, 6(2), 117-141.

Dalley, J. W., Cardinal, R. N., & Robbins, T. W. (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(7), 771-784.

Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, 65(1), 1-105.

De Melo, L. C. S., Cruz, A. P., Valentim Jr, S. J. R., Marinho, A. R., Mendonça, J. B., & Nakamura-Palacios, E. M. (2005). Δ^9 -THC administered into the medial prefrontal cortex disrupts the spatial working memory. *Psychopharmacology*, 183(1), 54-64.

De Souza Custódio, J. C., Martins, C. W., Lugon, M. D. M. V., Fregni, F., & Nakamura-Palacios, E. M. (2013). Epidural direct current stimulation over the left medial prefrontal cortex facilitates spatial working memory performance in rats. *Brain stimulation*, 6(3), 261-269.

Delgado, J. M., Hamlin, H., & Chapman, W. P. (1952). Technique of intracranial electrode implantation for recording and stimulation and its possible therapeutic value in psychotic patients. *Stereotactic and Functional Neurosurgery*, 12(5-6), 315-319.

D'Esposito, M. (2007). From cognitive to neural models of working memory. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 362(1481), 761-772.

European Medicines Agency. Acessado em: 20/01/2016
<http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002434/WC500130815.pdf>

Euston, D. R., Gruber, A. J., McNaughton, B. L. (2012). The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron*, 76(6), 1057-1070.

Evans RH, Francis AA, Hunt K, Oakes DJ, Watkins JC (1979). Antagonism of excitatory amino acid-induced responses and of synaptic excitation in the isolated spinal cord of the frog. *Br J Pharmacol*; 67(4):591-603.

Featherstone D.E. (2010). Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. *ACS Chem Neurosci*.; 1: 4-12.

Ferraguti, F., & Shigemoto, R. (2006). Metabotropic glutamate receptors. *Cell and tissue research*, 326(2), 483-504.

Floel, A., & Cohen, L. G. (2010). Recovery of function in humans: cortical stimulation and pharmacological treatments after stroke. *Neurobiology of disease*, 37(2), 243-251.

Floresco, S. B., & Phillips, A. G. (2001). Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D₁ agonist into the rat medial prefrontal cortex. *Behavioral neuroscience*, 115(4), 934.

Franco, V., Crema, F., Iudice, A., Zaccara, G., & Grillo, E. (2013). Novel treatment options for epilepsy: focus on perampanel. *Pharmacological Research*, 70(1), 35-40.

Fregni F, Boggio OS, Nitsche M, Bormpohl F, Antal A, Feredoes E, Marcolin MA, Rigonatti SP, Silva MTA, Paulus W, Pascual-Leone A (2005). Anodal transcranial direct current stimulation of prefrontal cortex enhances working memory. *Exp Brain Res*, 166: 23–30.

Fregni F, Boggio PS, Mansur CG, Wagner T, Ferreira MJ, Lima MC, Rigonatti SP, Marcolin MA, Freedman SD, Nitsche MA, Pascual-Leone A (2005). Transcranial direct current stimulation of the unaffected hemisphere in stroke patients. *Neuroreport*, 16(14), 1551-1555.

Fregni, F., Boggio, P. S., Santos, M. C., Lima, M., Vieira, A. L., Rigonatti, S. P., Pascual-Leone, A. (2006). Noninvasive cortical stimulation with transcranial direct current stimulation in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 21(10), 1693-1702.

Fregni F, Thome-Souza S, Nitsche MA, Freedman SD, Valente KD, Pascual-Leone A (2006). A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*, 47:335–42.

Fregni, F, Boggio PS, Nitsche MA, Marcolin M A, Rigonatti S P, & Pascual- Leone A (2006). Treatment of major depression with transcranial direct current stimulation. *Bipolar Disorders*, 8(2), 203–204.

Fregni, F., Nitsche, M. A., Loo, C. K., Brunoni, A. R., Marangolo, P., Leite, J., ... & Simis, M. (2015). Regulatory considerations for the clinical and research use of transcranial direct current stimulation (tDCS): Review and recommendations from an expert panel. *Clinical research and regulatory affairs*, 32(1), 22-35.

Fregni, F., Thome-Souza, S., Nitsche, M. A., Freedman, S. D., Valente, K. D., & Pascual-Leone, A. (2006). A controlled clinical trial of cathodal DC polarization in patients with refractory epilepsy. *Epilepsia*, 47(2), 335-342.

Freudenberg, F., Marx, V., Seeburg, P. H., Sprengel, R., & Celikel, T. (2013). Circuit mechanisms of GluA1-dependent spatial working memory. *Hippocampus*, 23(12), 1359-1366.

Fritsch, B., Reis, J., Martinowich, K., Schambra, H. M., Ji, Y., Cohen, L. G., & Lu, B. (2010). Direct current stimulation promotes BDNF-dependent synaptic plasticity: potential implications for motor learning. *Neuron*, 66(2), 198-204.

Funahashi, S. (2006). Prefrontal cortex and working memory processes. *Neuroscience*, 139, 251-261.

Fuster, J. M. (2002). Frontal lobe and cognitive development. *Journal of neurocytology*, 31(3-5), 373-385.

Fuster, J. M. (2001). The prefrontal cortex—an update: time is of the essence. *Neuron*, 30(2), 319-333.

Fuster, J. M. (2004). Upper processing stages of the perception-action cycle. *Trends in Cognitive Sciences*, v. 8, n. 4, p. 143–5.

Fycompa. Acessado em 18/03/2016 <<http://www.fycompa.eu/mode-of-action.php>>

Gartside, I. B. (1968). Mechanisms of sustained increases of firing rate of neurones in the rat cerebral cortex after polarization: role of protein synthesis. *Nature*, 383-384

Gathercole, S. E., & Baddeley, A. D. (2014). *Working memory and language*. Psychology Press.

George, M. S., & Aston-Jones, G. (2010). Noninvasive techniques for probing neurocircuitry and treating illness: vagus nerve stimulation (VNS), transcranial magnetic stimulation (TMS) and transcranial direct current stimulation (tDCS). *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 301-316.

Goto, Y., & Grace, A. A. (2006). Alterations in medial prefrontal cortical activity and plasticity in rats with disruption of cortical development. *Biological psychiatry*, 60(11), 1259-1267.

Guitar, N. A., & Roberts, W. A. (2015). The interaction between working and reference spatial memories in rats on a radial maze. *Behavioural processes*, 112, 100-107.

Gupta, K., Hardingham, G. E., & Chandran, S. (2013). NMDA receptor-dependent glutamate excitotoxicity in human embryonic stem cell-derived neurons. *Neuroscience letters*, 543, 95-100.

Hayashi, T. (1954). Effects of sodium glutamate on the nervous system. *The Keio Journal of Medicine*, 3(4), 183-192.

Hanada, T. (2014). The discovery and development of perampanel for the treatment of epilepsy. *Expert opinion on drug discovery*, 9(4), 449-458.

Housh, A. A., Berkowitz, L. E., Ybarra, I., Kim, E. U., Lee, B. R., & Calton, J. L. (2014). Impairment of the anterior thalamic head direction cell network following administration of the NMDA antagonist MK-801. *Brain research bulletin*, 109, 77-87.

Hummel F, Celnik P, Giraux P, Floel A, Wu WH, Gerloff C, & Cohen LG (2005). Effects of non-invasive cortical stimulation on skilled motor function in chronic stroke. *Brain*, 128(Pt 3), 490-499.

Izquierdo, I., Medina, J. H., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., de Souza, M. M., & e Souza, T. M. (1998). Short-and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiology of learning and memory*, 69(3), 219-224.

Jia, M., Njapo, S. A. N., Rastogi, V., & Hedna, V. S. (2015). Taming glutamate excitotoxicity: strategic pathway modulation for neuroprotection. *CNS drugs*, 29(2), 153-162.

Kolb, B. (1984). Functions of the frontal cortex of the rat: a comparative review. *Brain Research Reviews*, 8(1), 65-98.

Leonard, C. M. (2016). Finding prefrontal cortex in the rat. *Brain research*.

Lester, R. A., Clements, J. D., Tong, G., Westbrook, G., & Jahr, C. (2012). The time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. In *Oxford University Press*.

Levy R. A Short History of Stereotactic Neurosurgery. [updated 18-10-2007; cited 03-09-2011]; Available from: www.neurosurgery.org/cybermuseum/stereotactichall/stereoarticle

Li, H. B., Matsumoto, K., Yamamoto, M., Watanabe, H. (1997). NMDA but not AMPA receptor antagonists impair the delay-interposed radial maze performance of rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(1), 249-253.

Li, H., K. Matsumoto, and H. Watanabe (1998). An alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) antagonist and an N-methyl-D-aspartate (NMDA) channel blocker synergistically impair spatial memory in rats. *Biol Pharm Bull*. 21(11): p. 1228-30.

Liebetanz, D., Nitsche, M. A., Tergau, F., Paulus, W. (2002). Pharmacological approach to the mechanisms of transcranial DC-stimulation-induced after-effects of human motor cortex excitability. *Brain*, 125(10), 2238-2247.

Loane, D. J., Stoica, B. A., Tchantchou, F., Kumar, A., Barrett, J. P., Akintola, T., & Faden, A. I. (2014). Novel mGluR5 positive allosteric modulator improves functional recovery, attenuates neurodegeneration, and alters microglial polarization after experimental traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*, 11(4), 857-869.

Lugon, M. D. M. V., Batsikadze, G., Fresnoza, S., Grundey, J., Kuo, M. F., Paulus, W., Nakamura-palacios, E.M., Nitsche, M. A. (2015). Mechanisms of Nicotinic Modulation of Glutamatergic Neuroplasticity in Humans. *Cerebral Cortex*, bhv252.

Man, H. Y. (2011). GluA2-lacking, calcium-permeable AMPA receptors—inducers of plasticity?. *Current opinion in neurobiology*, 21(2), 291-298.

Marmioli, P., & Cavaletti, G. (2012). The glutamatergic neurotransmission in the central nervous system. *Current medicinal chemistry*, 19(9), 1269-1276.

Myhrer, T. (2003). Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Research Reviews*, 41(2), 268-287.

Pinto, M.C.X., Resende R.R. (2014). *Excitotoxicidade e doenças neurológicas*. Nanocell News. Edição Vol. 2, N. 04, ISSN 2318-5880, 02 de Dezembro de 2014.

McAllister, K. A. L., Mar, A. C., Theobald, D. E., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2015). Comparing the effects of subchronic phencyclidine and medial prefrontal

cortex dysfunction on cognitive tests relevant to schizophrenia. *Psychopharmacology*, 232(21-22), 3883-3897.

Monte-Silva, K., Kuo, M. F., Hessenthaler, S., Fresnoza, S., Liebetanz, D., Paulus, W., Nitsche, M. A. (2013). Induction of late LTP-like plasticity in the human motor cortex by repeated non-invasive brain stimulation. *Brain stimulation*, 6(3), 424-432.

Nakamura-Palacios, E. M., de Almeida Benevides, M. C., da Penha Zago-Gomes, M., de Oliveira, R. W. D., de Vasconcellos, V. F., de Castro, L. N. P., ... & Fregni, F. (2012). Auditory event-related potentials (P3) and cognitive changes induced by frontal direct current stimulation in alcoholics according to Lesch alcoholism typology. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 15(5), 601-616. Nakamura-Palacios EM, Roelke CE (1997). Effects of acute ou daily administration of diazepam on spatial learning and working memory. *Drug and Alcohol Depend*, 46: 181 – 90

Nakamura-Palacios EM (2011). Working Memory and Prefrontal Cortex and Their Relation with the Brain Reward System and Drug Addiction. In: LEVIN, ES (Org.). Working Memory: Capability, Developments and Improvement Techniques. New York: NOVA Publishers, p. 109-140.

Nicholls, David G (1993). "The glutamatergic nerve terminal." *European Journal of Biochemistry* 212.3: 613-631.

Nitsche MA, Cohen LG, Wassermann EM, Priori A, Lang N, Antal A, Paulus W, Hummel F, Boggio PS, Fregni F, Pascual-Leone A (2008). Transcranial direct current Stimulation: state of the art 2008. *Brain Stimul*, 1:206–23.

Nitsche MA, Fricke K, Henschke U, Schlitterlau A, Liebetanz D, Lang N, Henning S, Tergau F, Paulus W (2003). Pharmacological modulation of cortical excitability shifts induced by transcranial direct current stimulation in humans. *J Physiol*, 553(Pt 1), 293-301.

Nitsche, M. A. (2015). Physiology, and functional effects of tDCS and related techniques. *Clinical Neurophysiology*, 126(9), e173.

Nitsche, M. A., & Paulus, W. (2001). Sustained excitability elevations induced by transcranial DC motor cortex stimulation in humans. *Neurology*, 57(10), 1899-1901.

Nitsche, M. A., Liebetanz, D., Lang, N., Antal, A., Tergau, F., & Paulus, W. (2003). Safety criteria for transcranial direct current stimulation (tDCS) in humans. *Clin Neurophysiol*, 114(11), 2220-2222; author reply 2222-2223.

Nitsche, M. A., Niehaus, L., Hoffmann, K. T., Hengst, S., Liebetanz, D., Paulus, W., & Meyer, B. U. (2004). MRI study of human brain exposed to weak direct current stimulation of the frontal cortex. *Clin Neurophysiol*, 115(10), 2419-2423.

Nitsche, M. A., Schauenburg, A., Lang, N., Liebetanz, D., Exner, C., Paulus, W., & Tergau, F. (2003). Facilitation of implicit motor learning by weak transcranial direct current stimulation of the primary motor cortex in the human. *Journal of cognitive neuroscience*, 15(4), 619-626.

Olton, D. S. (1987). The radial arm maze as a tool in behavioral pharmacology. *Physiology & Behavior*, 40(6), 793-797.

Olton DS (1976). Samuelson, RJ. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, Vol 2(2), 97-116.

Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev a a, Gibbs TT, Farb DH (1997) Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol* 52:1113–1123.

Parsons, Chris G., Albrecht Stöffler, and Wojciech Danysz (2007). "Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system-too little activation is bad, too much is even worse." *Neuropharmacology* 53.6: 699-723.

Patsalos, P. N. (2015). The clinical pharmacology profile of the new antiepileptic drug perampanel: a novel noncompetitive AMPA receptor antagonist. *Epilepsia*, 56(1), 12-27.

Paxinos G, Watson C (1986). The rat brain in the stereotaxic coordinates. United Kingdom, edition published by academic press limited, second edition, Fig. 9.

Pelletier, S. J., & Cicchetti, F. (2015). Cellular and molecular mechanisms of action of transcranial direct current stimulation: evidence from in vitro and in vivo models. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 18(2), pyu047.

Podda, M. V., Cocco, S., Mastrodonato, A., Fusco, S., Leone, L., Barbati, S. A., & Grassi, C. (2016). Anodal transcranial direct current stimulation boosts synaptic plasticity and memory in mice via epigenetic regulation of Bdnf expression. *Scientific reports*, 6.

Powell, K. B., & Voeller, K. K. (2004). Prefrontal executive function syndromes in children. *Journal of Child Neurology*, 19(10), 785-797.

Priori, A (2003). Brain polarization in humans: a reappraisal of an old tool for prolonged noninvasive modulation of brain excitability. *Clin. Neurophysiol.* 114:589–95.

Rahman, A., Reato, D., Arlotti, M., Gasca, F., Datta, A., Parra, L. C., & Bikson, M. (2013). Cellular effects of acute direct current stimulation: somatic and synaptic terminal effects. *The Journal of physiology*, 591(10), 2563-2578.

Ramadan, Saadallah, Alexander Lin, and Peter Stanwell (2013). "Glutamate and glutamine: a review of in vivo MRS in the human brain." *NMR in Biomedicine*: 26.12 1630-1646.

Renzel, R., Sadek, A. R., Chang, C. H., Gray, W. P., Seifert, G., & Steinhäuser, C. (2013). Polarized distribution of AMPA, but not GABAA, receptors in radial glia-like cells of the adult dentate gyrus. *Glia*, 61(7), 1146-1154.

Rheims, S., & Ryvlin, P. (2013). Profile of perampanel and its potential in the treatment of partial onset seizures. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 9, 629.

Ridderinkhof, K. R., Ullsperger, M., Crone, E. A., & Nieuwenhuis, S. (2004). The role of the medial frontal cortex in cognitive control. *science*, 306(5695), 443-447.

- Riedel, G., Platt, B., & Micheau, J. (2003). Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural brain research*, 140(1), 1-47.
- Robbins, T. W. (2000). From arousal to cognition: the integrative position of the prefrontal cortex. *Progress in brain research*, 126, 469-483.
- Rogawski MA, Hanada T (2013). Preclinical pharmacology of perampanel, a selective non-competitive AMPA receptor antagonist. *Acta Neurol Scand*: 127 (Suppl. 197): 19–24. © 2013 John Wiley & Sons A/S.
- Rush, S., & Driscoll, D. A. (1968). Current distribution in the brain from surface electrodes. *Anesthesia & Analgesia*, 47(6), 717-723.
- Rushworth, M. F., Noonan, M. P., Boorman, E. D., Walton, M. E., & Behrens, T. E. (2011). Frontal cortex and reward-guided learning and decision-making. *Neuron*, 70(6), 1054-1069.
- Sanacora, G., Zarate, C. A., Krystal, J. H., & Manji, H. K. (2008). Targeting the glutamatergic system to develop novel, improved therapeutics for mood disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(5), 426-437.
- Sanderson, D. J., Good, M. A., Seeburg, P. H., Sprengel, R., Rawlins, J. N. P., & Bannerman, D. M. (2008). The role of the GluR-A (GluR1) AMPA receptor subunit in learning and memory. *Progress in brain research*, 169, 159-178.
- Schwartzkroin P.A., Wester K. (1975). Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. *Brain Res.*89:107-119.
- Seeburg, P. H., Burnashev, N., Kohr, G. E. O. R. G., Kuner, T., Sprengel, R., & Monyer, H. (2013). The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. *Recent Prog Horm Res*, 50, 19-34.
- Shin, Y. I., Foerster, Á., & Nitsche, M. A. (2015). Reprint of: Transcranial direct current stimulation (tDCS)—Application in neuropsychology. *Neuropsychologia*, 74, 74-95.
- Sironi VA (2011). Origin and evolution of deep brain stimulation. *Front IntegrNeurosci.*;5:42.

Snigdha, S., Horiguchi, M., Huang, M., Li, Z., Shahid, M., Neill, J. C., & Meltzer, H. Y. (2010). Attenuation of phencyclidine-induced object recognition deficits by the combination of atypical antipsychotic drugs and pimavanserin (ACP 103), a 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor inverse agonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(2), 622-631.

Snyder, E. M., Philpot, B. D., Huber, K. M., Dong, X., Fallon, J. R., & Bear, M. F. (2001). Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation. *Nature neuroscience*, 4(11), 1079-1085.

Stagg, C. J., & Nitsche, M. A. (2011). Physiological basis of transcranial direct current stimulation. *The Neuroscientist*, 17(1), 37-53.

Stroeh E. Estudo do inibidor da 3-Hidróxi 3-Metilglutaril-Coenzima A Redutase (Atorvastatina) na Transmissão e Toxicidade Glutamatérgica (monografia). Florianópolis: UFSC, 2008. 53 p. 5.

Summers, J. J., Kang, N., & Cauraugh, J. H. (2016). Does transcranial direct current stimulation enhance cognitive and motor functions in the ageing brain? A systematic review and meta-analysis. *Ageing research reviews*, 25, 42-54.

Tomita, S., Chen, L., Kawasaki, Y., Petralia, R. S., Wenthold, R. J., Nicoll, R. A., & Brecht, D. S. (2003). Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *The Journal of cell biology*, 161(4), 805-816.

Tsai, G., & Coyle, J. T. (2002). Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42(1), 165-179.

US Food and Drug Administration FDA. Clinical pharmacology review. Reference ID: 3205587. 2012. Acessado em: 25/01/2016 <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/UCM332052.pdf>>.

Uylings, H. B., Groenewegen, H. J., Kolb, B. (2003). Do rats have a prefrontal cortex?. *Behavioural brain research*, 146(1), 3-17.

- van der Staay, F. J., Rutten, K., Erb, C., & Blokland, A. (2011). Effects of the cognition impairer MK-801 on learning and memory in mice and rats. *Behavioural brain research*, 220(1), 215-229.
- Vishnoi, S., Raisuddin, S., & Parvez, S. (2015). Modulatory effects of an NMDAR partial agonist in MK-801-induced memory impairment. *Neuroscience*, 311, 22-33.
- Wang, X., Gu, Z., Zhong, P., Chen, G., Feng, J., & Yan, Z. (2006). Aberrant regulation of NMDA receptors by dopamine D 4 signaling in rats after phencyclidine exposure. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(1), 15-25.
- Weil-Malherbe, H (1950). "Significance of glutamic acid for the metabolism of nervous tissue." *Physiological reviews* 30.4: 549-568.
- Wood, J. N., & Grafman, J. (2003). Human prefrontal cortex: processing and representational perspectives. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(2), 139-147.
- Wright, A. L., & Vissel, B. (2012). The essential role of AMPA receptor GluR2 subunit RNA editing in the normal and diseased brain. *Frontiers in molecular neuroscience*, 5, 34.
- Yernool D, Boudker O, Jin Y, Gouaux E (2004). Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature*.481:811-18.
- Yuen, E. Y., Liu, W., Karatsoreos, I. N., Ren, Y., Feng, J., McEwen, B. S., & Yan, Z. (2011). Mechanisms for acute stress-induced enhancement of glutamatergic transmission and working memory. *Molecular psychiatry*, 16(2), 156-170.
- Yoshihara, T., & Ichitani, Y. (2004). Hippocampal N-methyl-D-aspartatereceptor-mediated encoding and retrieval processes in spatial working memory: delay-interposed radial maze performance in rats. *Neuroscience*, 129(1), 1-10.
- Yuen, E. Y., Wei, J., Liu, W., Zhong, P., Li, X., & Yan, Z. (2012). Repeated stress causes cognitive impairment by suppressing glutamate receptor expression and function in prefrontal cortex. *Neuron*, 73(5), 962-977.